

**Biochemische und molekularbiologische
Untersuchungen zum 3,6-Dichlor-2-
methoxybenzoat-Abbau durch
Sphingomonas sp. RW5**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von

Jörn Werwath

aus

Bielefeld

| | |
|-------------------------------------|----------------------------|
| 1. Referentin oder Referent: | Professor Dr. K. N. Timmis |
| 2. Referentin oder Referent: | Professor Dr. J. Wehland |
| eingereicht am: | 08.07.1998 |
| mündliche Prüfung (Disputation) am: | 27.11.1998 |

Vorabveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch die Mentorin oder den Mentor / die Betreuerin oder den Betreuer der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen:

J. Werwath, H.A. Arfmann, D.H.Pieper, K.N. Timmis und R.-M. Wittich.

Biochemical and Genetic Characterisation of a Gentisate 1,2-Dioxygenase from *Sphingomonas* sp. strain RW5; J. Bacteriol., Vol. 180, No. 16, 4171-4176

Tagungsbeiträge:

J. Werwath, E. Moore, D.H.Pieper, K.N. Timmis und R.-M. Wittich.

Characterisation of *Sphingomonas* sp. strain RW5 capable of degrading DICAMBA, UIB-GBF-CSIC-TUB-Symposium, Biodegradation of organic pollutants, Mallorca, 1996

J. Werwath, E. Moore, D.H.Pieper, K.N. Timmis und R.-M. Wittich.

Degradation of the Herbicide DICAMBA via 3,6-Dichlorogentisate by *Sphingomonas* sp. strain RW5, Frühjahrstagung der VAAM 1997, Hamburg

J. Werwath, D.H.Pieper, K.N. Timmis und R.-M. Wittich.

A novel Gentisate 1,2-dioxygenase from *Sphingomonas* sp. strain RW5: Purification of the enzyme and cloning of its gene, VI International Congress on *Pseudomonas*, Madrid, 1997

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| 1 EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 UMWELTSCHADSTOFFE: VORKOMMEN UND DEREN MIKROBIELLER ABBAU | 1 |
| 1.2 SALICYLATE ALS ZENTRALE INTERMEDIATE BEIM ABBAU POLYCYCLISCHER AROMATEN | 2 |
| 1.2.1 Der Abbau von Salicylat über den Brenzkatechin-Abbauweg | 2 |
| 1.2.2 Der Abbau von Salicylat über den Gentisat-Abbauweg | 3 |
| 1.2.3 Der mikrobielle Abbau chlorierter Salicylate | 6 |
| 1.3 DER MIKROBIELLE ABBAU DES HERBIZIDS 3,6-DICHLOR-2-METHOXYBENZOAT | 7 |
| 1.4 ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT | 9 |
| 2 MATERIAL UND METHODEN | 10 |
| 2.1 NÄHRMEDIEN, PUFFER UND LÖSUNGEN | 10 |
| 2.2 STÄMME UND PLASMIDE, HERKUNFT UND STAMMHALTUNG | 11 |
| 2.3 ZELLANZUCHT UND ZELLERNTTE | 13 |
| 2.4 IDENTIFIZIERUNG DES STAMMES RW5 | 13 |
| 2.4.1 Identifizierung mit dem BIOLOG-Test | 13 |
| 2.4.2 Identifizierung durch Analyse der 16S rDNA Sequenz | 14 |
| 2.5 DNA-ABHÄNGIGE TECHNIKEN | 18 |
| 2.5.1 Präparation von Gesamt-DNA aus Sphingomonaden | 18 |
| 2.5.2 Southern-Blot-Analyse | 18 |
| 2.5.3 DNA-Sequenzanalysen | 19 |
| 2.5.4 Klonierung des Gens für die Gentisinsäure-1,2-Dioxygenase | 19 |
| 2.5.5 Klonierung der Upstream Region des Gens für die Gentisinsäure-1,2-Dioxygenase | 20 |
| 2.5.6 Überexpression klonierter Gene | 20 |
| 2.6 UNTERSUCHUNGEN ZUM WACHSTUM | 21 |
| 2.6.1 Messung der Optischen Dichte (OD) | 21 |
| 2.6.2 Gesamtzellzahlbestimmung in der THOMA-Kammer | 21 |
| 2.6.3 Messung der Substrat- und Produktkonzentrationen | 22 |
| 2.6.4 Messung der Chlorid-Konzentration | 22 |
| 2.6.5 Isolierung von Metaboliten aus Kulturüberständen | 22 |
| 2.7 MESSUNG DER SAUERSTOFFAUFNAHMERATEN VON ZELLSUSPENSIONEN | 23 |
| 2.8 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN | 24 |
| 2.8.1 Herstellung zellfreier Extrakte | 24 |
| 2.8.2 Bestimmung von Proteingehalten | 24 |
| 2.8.3 Bestimmung von Enzymaktivitäten | 25 |
| 2.8.4 Proteinaufreinigung | 28 |
| 2.8.5 Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen | 31 |
| 2.8.6 N-terminale Aminosäuresequenzanalyse | 33 |

| | |
|--|-----------|
| 2.9 SPEKTROSKOPISCHE UND CHROMATOGRAPHISCHE VERFAHREN | 34 |
| 2.9.1 Gaschromatographie und Massenspektroskopie (GC/MS) | 34 |
| 2.9.2 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)..... | 35 |
| 2.9.3 Analytische HPLC..... | 35 |
| 2.9.4 Präparative HPLC | 36 |
| 2.10 CHEMIKALIEN..... | 37 |
| 2.11 DATENVERARBEITUNG - SOFTWARE | 37 |
| 3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION | 38 |
| 3.1 IDENTIFIZIERUNG DES STAMMES RW5 | 38 |
| 3.1.1 Anreicherung und Isolierung des Stammes RW5..... | 38 |
| 3.1.2 Identifizierung des Stammes RW5 mit dem Biolog-Test | 38 |
| 3.1.3 Identifizierung des Stammes RW5 durch 16S rDNA-Analyse | 39 |
| 3.2 UNTERSUCHUNGEN ZUM ABBAUPOTENTIAL VON STAMM RW5..... | 42 |
| 3.2.1 Substratverwertung des Stammes RW5 | 42 |
| 3.2.2 Wachstum des Stammes RW5 mit 36DC2MBA und 3,6-Dichlorsalicylat..... | 44 |
| 3.2.3 Identifizierung von 3,6-Dichlorgentisat als Metabolit während des Wachstums mit 36DC2MBA bzw. 3,6-Dichlorsalicylat..... | 47 |
| 3.2.4 Bestimmung von Sauerstoffaufnahme-raten von Ruhezellen des Stammes RW5..... | 48 |
| 3.3 ENZYMAKTIVITÄTEN IN ZELLFREIEN EXTRAKTEN DES STAMMES RW5 | 51 |
| 3.3.1 Transformation von Maleylpyruvat mit zellfreien Extrakten des Stammes RW5 | 55 |
| 3.4 ZUSAMMENFASSUNG DES PHYSIOLOGISCHEN TEILS..... | 56 |
| 3.5 MOLEKULARBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN DES 36DC2MBA-ABBAUS | 58 |
| 3.6 AUFREINIGUNG DER GENTISINSÄURE-1,2-DIOXYGENASE (GDO) AUS ZELLFREIEN EXTRAKTEN DES STAMMES RW5 | 58 |
| 3.6.1 Aminosäure-Sequenzierung der gereinigten Gentisinsäure-1,2-Dioxygenase..... | 59 |
| 3.7 KLONIERUNG UND SEQUENZIERUNG DES DIE GENTISINSÄURE-1,2-DIOXYGENASE KODIERENEN GTDA-GENS UND DESSEN UMGEBUNG..... | 60 |
| 3.7.1 Herstellung einer für die Gentisinsäure-1,2-Dioxygenase spezifischen Gensonde..... | 60 |
| 3.7.2 Klonierung und Sequenzierung des Gentisinsäure-1,2-Dioxygenase-Gen..... | 60 |
| 3.7.3 Nukleotidsequenzanalyse des Plasmides pJW39 | 61 |
| 3.7.4 Klonierung und Sequenzierung der Region oberhalb von gtdA | 68 |
| 3.7.5 Sequenzanalyse der Region oberhalb von gtdA in pJW9 | 68 |
| 3.8 CHARAKTERISIERUNG DER REKOMBINANTEN GENTISINSÄURE-1,2-DIOXYGENASE | 72 |
| 3.8.1 Überexpression der rekombinanten Gentisinsäure-1,2-Dioxygenase | 72 |
| 3.8.2 Aufreinigung und Charakterisierung der in E. coli BL21 überexprimierten Gentisinsäure-1,2- Dioxygenase | 72 |
| 3.8.3 Identifizierung von Maleylpyruvat als Produkt der dioxygenolytischen Ringspaltung von Gentisinsäure durch die Gentisinsäure-1,2-Dioxygenase | 76 |
| 3.8.4 Kinetische Charakterisierung der Gentisinsäure-1,2-Dioxygenase..... | 77 |

| | |
|--|-----------|
| 3.9 VERSUCH ZUR ÜBEREXPRESSION DER REKOMBINANTEN ORFs 2-4 VON PLASMID PJW39..... | 78 |
| 4 ZUSAMMENFASSUNG | 84 |
| 5 LITERATURVERZEICHNIS | 86 |
| 6 ANHANG | 97 |

1 Einleitung

1.1 Umweltschadstoffe: Vorkommen und deren mikrobieller Abbau

Pro Jahr werden weltweit ca. 1000 neue chemische Verbindungen entwickelt, von denen eine Vielzahl in signifikanter Menge in die Biosphäre eingebracht werden (Fewson 1988). Unter diesen Verbindungen befinden sich auch zahlreiche Substanzen, die aufgrund ihrer biologischen Langlebigkeit nicht oder nur sehr langsam abgebaut werden und sich dadurch in der Umwelt anreichern können. Diese, überwiegend abiotischen, Syntheseprodukte werden auch als "Xenobiotika" bezeichnet (Knackmuss 1983; Fewson 1988). Die gesamte Weltproduktion an synthetisch-organischen Chemikalien beläuft sich auf über 300 Millionen Tonnen pro Jahr. Dabei spielen in der Industrie besonders die organischen Chlorverbindungen, die unter anderem als Grundchemikalien eingesetzt werden, eine wichtige Rolle (Geckeler 1995). Zu den wichtigsten chlororganischen Substanzen gehören neben Lösungsmitteln (z.B. Dichlormethan und Tetrachlorethen (PER)) und den chlorhaltigen Kunststoffen (z.B. Chlorkautschuk oder PVC), auch die chlorhaltigen Pestizide wie DDT, Lindan, Dieldrin etc. Dabei existierten bis zu Beginn der 80er Jahre nur für rund 1000 der 5 Millionen beschriebenen chemischen Verbindungen verlässliche ökotoxikologische Daten (Ghisalba 1983).

Beim Abbau von Xenobiotika in der Ökosphäre spielen die natürlichen Abbauleistungen von Mikroorganismen der Destruentengesellschaft eine zentrale Rolle. Für einige Xenobiotika konnten in der Vergangenheit mikrobielle Abbauprozesse beschrieben werden (Ghisalba 1983; Chaudhry 1991; Singleton 1993). Es gibt aber immer noch zahlreiche Substanzen wie z.B. polyhalogenierte Dibenzofurane, Dibenzo-*p*-dioxine oder Diphenylether, für die noch keine diese Substanzen abbauenden Organismen bzw. nur unbefriedigende Abbauewege gefunden werden konnten (Wittich 1994). So ist in der Zwischenzeit das als Seveso-Gift bekannte und für Säuger wie für den Menschen toxische 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin in der Umwelt ubiquitär verbreitet (Heintz 1991). Mit Dioxinen besonders hoch belastete Standorte sind neben den Produktionsstätten der Halogen-Chemie z.B. Abgase von Müllverbrennungsanlagen oder Sickeröle aus belasteten Deponien. Alleine in der öligen Phase des Sickeröls der Mülldeponie Hamburg-Georgswerder sind bis zu 2 mg/kg tetrachlorierte Dioxine enthalten, während die Hintergrundbelastung noch im Femtogrammbereich (pro kg) liegt. Da Mikroorganismen mit vielen xenobiotischen Substanzen erst seit einigen Jahrzehnten verstärkt

konfrontiert werden, konnten sich trotz ihrer kurzen Generationszeiten und der hohen genetischen Flexibilität nicht für alle Problemstoffe Abbausequenzen entwickeln.

Neben der Minimierung der Freisetzung von Xenobiotika in die Umwelt erhält die Sanierung hochgradig kontaminierter Standorte ein immer größeres Gewicht. Zur Sanierung solcher kontaminierter Standorte sind neben zahlreicher chemischer Verfahren verschiedene biologische Sanierungsstrategien denkbar: Eine grundlegende Strategie ist die Suche nach Mikroorganismen, die bisher als nicht-abbaubar geltende Xenobiotika mineralisieren können. Eine zweite Strategie stellt der Einsatz von Mischkulturen dar, deren Abbauleistungen sich so ergänzen, daß eine möglichst große Anzahl der Xenobiotika kontaminierter Standorte abgebaut werden. Eine weitere Strategie verfolgt das Ziel, mittels gentechnischer Methoden das Abbaupotential von Mikroorganismen zu optimieren, um so Mikroorganismen mit einem dem kontaminierten Standort entsprechend möglichst großen Substratspektrum zu erhalten.

1.2 Salicylate als zentrale Intermediate beim Abbau polycyclischer Aromaten

Salicylat stellt ein zentrales Intermediat beim aeroben Abbau verschiedener aromatischer Substanzen dar. So entsteht Salicylat während des Abbaus von Dibenzofuran (Fortnagel 1990), Naphthalinen (Starovoitov et al. 1975; Grund 1992) oder Anthranilat (Ladd 1962). Chlorierte Salicylate wie z.B. 3-, 4- oder 5-Chlorosalicylat bzw. 4,5-Dichlorosalicylat entstehen beim Abbau chlorierter Dibenzofurane durch *Sphingomonas* sp. strain RW 1 (Wilkes et al. 1996). 3,6-Dichlorosalicylat wird beim Abbau von 1,4-Dichlornaphthalin (Durham und Stewart 1987) oder während des Abbaus des Pestizids 36DC2MBA (2-Methoxy-3,6-dichlorbenzoat) gebildet (Smith 1973). Für den mikrobiellen Abbau von Salicylat sind bisher 2 Abbauewege bekannt (Ohmoto et al. 1991) (Abbildung 1). Man unterscheidet den Salicylatabbau über den Brenzkatechin-Abbaueweg und über den Gentisat-Abbaueweg.

1.2.1 Der Abbau von Salicylat über den Brenzkatechin-Abbaueweg

Salicylat kann durch Hydroxylierung bei gleichzeitiger Decarboxylierung in 1-Position zu Brenzkatechin transformiert werden (Abbildung 1). Diese Reaktion wird durch die Salicylat-1-Hydroxylase (EC 1.14.13.1) katalysiert. Die Salicylat-1-Hydroxylase ist ein FAD-abhängiges

Enzym und benötigt NADH als Wasserstoff- bzw. Elektronendonator (Yamamoto 1965). Die Gene für die Salicylat-1-Hydroxylase wurden bereits mehrfach kloniert (Schell 1983; Hasegawa 1994; Lee 1995). Brenzkatechin kann über zwei verschiedene Abbauewege mineralisiert werden: durch die Brenzkatechin-1,2-Dioxygenase wird Brenzkatechin in *ortho*-Position gespalten und nachfolgend über den *b*-Ketoacidweg abgebaut werden (Stanier und Ornston 1973) (Abbildung 1). Brenzkatechin kann auch in *meta*-Position durch eine Brenzkatechin-2,3-Dioxygenase zu 2-Hydroxymuconatsemialdehyd gespalten werden, das über den sog. *meta*-Spaltungsweg (Abbildung 1) abgebaut wird, wie es z.B. für den Naphthalin-abbauenden Stamm *Pseudomonas putida* beschrieben wurde (Dunn 1964).

1.2.2 Der Abbau von Salicylat über den Gentisat-Abbaueweg

Ein weiterer Abbaueweg von Salicylat verläuft über den sog. Gentisat-Abbaueweg (Abbildung 1) (Yano 1958; Buswell 1980; Monticello et al. 1985; Ohmoto et al. 1991). Dieser beginnt mit der Hydroxylierung des Salicylats in 5-Position zu Gentisat durch eine Salicylat-5-Hydroxylase. Für die Salicylat 5-Hydroxylase (Abbildung 1) konnten GRUND et al. (1992) für den Stamm *Pseudomonas* sp. B4 erstmalig nachweisen, daß ATP, CoA und NADPH als Co-Substrate benötigt werden. Dieser Befund deutet möglicherweise auf eine Beteiligung einer Salicylat-CoA-Ligase an der Monooxygenierung von Salicylat zu Gentisat hin. Bisher wurde eine CoA-Ligase nur bei anaeroben Reaktionen, beispielsweise der reduktiven Dehalogenierung von 4-Chlorbenzoat, nachgewiesen (Löffler 1985; Scholten 1991). Fuenmayor et al. (1998) beschrieben erstmals die Klonierung der für eine Salicylat-5-Hydroxylase kodierenden Gene aus dem Naphthalin-abbauenden Stamm *Pseudomonas* sp. U2. Diese Salicylat-5-Hydroxylase war vollständig aktiv, wenn insgesamt 4 Gene expremiert wurden: *nagG* und *nagH*, die jeweils für eine 48,8 kDa große Untereinheit und eine 18,8 kDa große Untereinheit des Monooxygenase-Systems kodieren, sowie das für

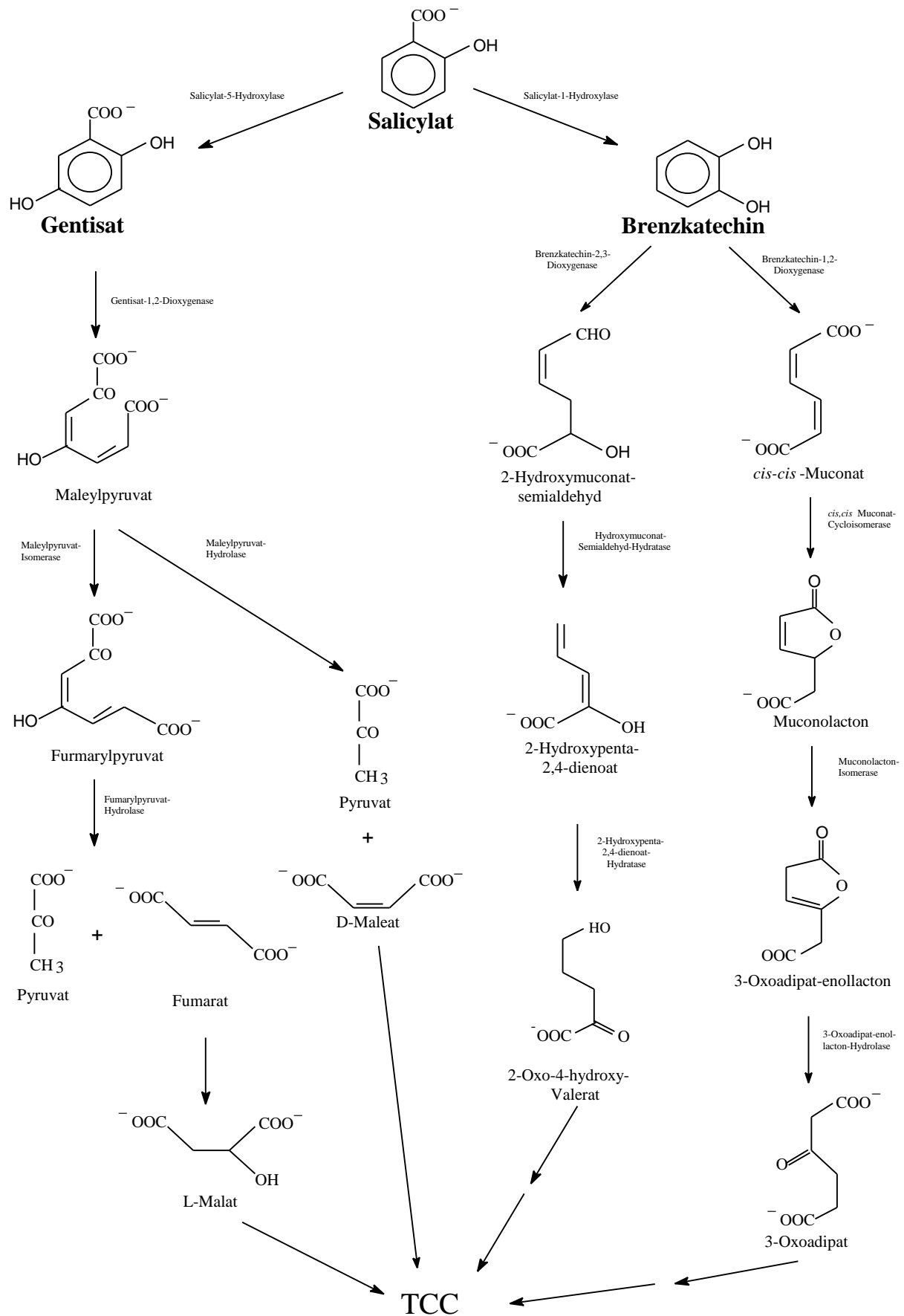


Abbildung 1: Abbau von Salicylat über Gentisat (links) und über Brenzkatechin (rechts).

ein Ferredoxin kodierende *nagAb* und eine von *nagAa* kodierte Ferredoxin-Reduktase. Vermutlich liefern die Ferredoxin-Untereinheiten Elektronen aus einem reduzierten Nikotinamid-Cofaktor an die beiden Monooxygenase-Untereinheiten der Salicylat-5-Hydroxylase. Das gebildete Gentisat wird von einer Gentisat-1,2-Dioxygenase (GDO) (EC 1.13.14.1, gentisate: oxygen oxidoreductase) zu Maleylpyruvat umgesetzt (Lack 1959). Obwohl der Mechanismus der Sauerstoffaktivierung dem der extradiolisch spaltenden Dioxygenasen ähnlich sein soll (Harpel und Lipscomb 1990) und das aktive Zentrum der GDO Fe^{2+} enthält (Sugiyama et al. 1958; Crawford et al. 1975; Harpel 1990; Kiemer et al. 1996; Suarez et al. 1996) ist dieses Fe^{2+} , nicht wie bei den extradiolisch spaltenden Dioxygenasen (Harayama et al. 1992) durch Elektronen liefernde Aminosäureliganden wie Cystein und Tyrosin gebunden (Harpel 1990). Es wird daher vermutet, daß die GDO eine neue Klasse ringspaltender Dioxygenasen darstellt. GDOs wurden aus Stämmen gram-positiver Bakterien der Gattungen *Bacillus* und *Rhodococcus* (Suemori et al. 1993; Kiemer et al. 1996) und gram-negativer Bakterien der Gattungen *Klebsiella*, *Comamonas* und *Moraxella* (Crawford 1975; Harpel 1990; Suarez 1996) aufgereinigt und charakterisiert. Amino-terminale Sequenzen zweier GDOs der Stämme *Comamonas testosteroni* und *Comamonas* wurden von Harpel und Lipscomb (Harpel 1990) erstmals beschrieben, aber bis heute wurden weder die vollständige Aminosäuresequenzen einer GDO noch die korrespondierenden Gene identifiziert und beschrieben.

Das aus der Spaltung von Gentisat gebildete Maleylpyruvat kann mittels einer Maleylpyruvat-Isomerase zu Fumarylpyruvat umgesetzt werden, das durch eine Fumarylpyruvat-Hydrolaseaktivität in Pyruvat und Fumarat gespalten wird (Lack 1959). Diese Isomerisierungsreaktion ist für einige Stämme z.B. der Gattung *Pseudomonas* (Lack 1959; Lack 1961) als Glutathion-abhängige Reaktion beschrieben. Es wurden allerdings auch zahlreiche Bakterien, z.B. der Gattungen *Moraxella* oder *Bacillus* isoliert, bei denen diese Reaktion Glutathion-unabhängig erfolgte. Abweichend von diesem Abbauweg konnten HOPPER et al. (1968) eine direkte hydrolytische Spaltung von Maleylpyruvat in Pyruvat und D-Maleat, insbesondere für alkylsubstituierte Substrate, zeigen (Hopper et al. 1968). Die Produkte der hydrolytischen Spaltung von Maleylpyruvat bzw. Fumarylpyruvat können direkt in den Zitronensäurezyklus (TCC) eingeschleust und somit vollständig metabolisiert werden.

1.2.3 Der mikrobielle Abbau chlorierter Salicylate

Der Abbau von chlorierten Salicylaten ist bisher nur für einige dieser Verbindungen, insbesondere für die monochlorierten, beschrieben worden. Für die meisten der bisher beschriebenen monochlorierten Salicylate wird ein Abbau über einen (modifizierten) Chlorgentisat-Abbauweg vermutet. 3-Chlorsalicylat soll von einem Stamm der Gattung *Nocardia* über einen Chlorgentisat-Weg abgebaut werden können (Hagedorn 1980). Durch Identifikation von Kulturmetaboliten, Enzymtests und die Bestimmung von Sauerstoffaufnahmeraten mit möglichen Abbaumetaboliten konnte auf einen Abbauweg geschlossen werden, der von 3-Chlorsalicylat über 3-Chlorgentisat und dessen Ringspaltungsprodukt 3-Chlormaleylpyruvat zu 2-Chlormaleat und Pyruvat führt. 4-Chlorsalicylat wird von einem gram-negativen Bakterium, das als *Variovorax* sp. 33 identifiziert wurde, ebenfalls über einen Chlorgentisat-Abbauweg abgebaut (Schmitz et al. 1997). CRAWFORD et al. (1979) postulierten den Abbau von 5-Chlorsalicylat durch *Bacillus brevis* mittels einer neuartigen 5-Chlorsalicylat-1,2-Dioxygenase und eines modifizierten Chlorgentisat-Abbauweges (Crawford 1979). Chlorierte Salicylate können aber auch über einen Chlorbrenzkatechin-Abbauweg abgebaut werden. LEHRBACH et al. (1984) konstruierten durch den Transfer der Gene für eine Toluat 1,2-Dioxygenase (*XylD*), der Dihydrodihydroxybenzoat Dehydrogenases (*XylL*) des Plasmids pWW0-161 (Franklin et al. 1981) und einer Salicylat Hydroxylase (*nahG*) aus dem NAH7-Plasmids (Yen 1982; Schell 1983) in den Stamm *Pseudomonas* sp. B13 einen Hybridstamm, der 3-, 4- und 5-Chlorsalicylat über den Chlorbrenzkatechin-Abbauweg abbaut. RUBIO et al. (1986) beschrieben ebenfalls den Abbau von 3-, 4- und 5-Chlorsalicylat über den Chlorbrenzkatechin-Abbauweg durch einen Hybrid-Stamm der Gattung *Pseudomonas*, der durch Konjugation der Chlorbrenzkatechinabbau-Gene aus *Pseudomonas* sp. B13 in den Methylsalicylat verwertenden Stamm *Pseudomonas* sp. WR 401 erzeugt wurde.

Für dichlorierte Salicylate liegen bisher nur Arbeiten über den mikrobiellen Abbau von 3,5- und 3,6-Dichlorsalicylat vor. 3,5-Dichlorsalicylat wird von *Burkholderia* sp. JWS (früher *Pseudomonas*) über den Chlorbrenzkatechinabbauweg abgebaut (Schindowski et al. 1991). KRUEGER et al. (1990) konnten den Abbau von 3,5-Dichlorsalicylat und 5-Chlorsalicylat durch *Flavobacterium breve* über einen Chlorbrenzkatechin-Abbauweg zeigen (Krueger 1990). Der Abbau von 3,6-Dichlorsalicylat wurde bisher nur im Rahmen des Abbaus von 3,6-

Dichlor-2-methoxybenzoat untersucht (Smith 1973; Smith 1974; Smith 1975; Taraban et al. 1993; Weks et al. 1994; Yang et al. 1994; Wang 1995; Yang 1995).

1.3 Der mikrobielle Abbau des Herbizids 3,6-Dichlor-2-methoxybenzoat

3,6-Dichlor-2-methoxybenzoat (36DC2MBA, Abbildung 2) wird als Herbizid bei Getreidesaaten eingesetzt (Domsch 1992). Es zeichnet sich durch eine hohe Effizienz im Einsatz als Herbizid, niedrige Kosten und große Stabilität nach der Applikation aus (Yang 1995). Der Wirkmechanismus von 36DC2MBA ist bisher nicht vollständig bekannt. Es wird angenommen, daß 36DC2MBA, wie auch das Pestizid 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure, eine ähnliche Wirkung wie das natürliche Pflanzenhormon Indoleessigsäure besitzt, das in den Wachstumsprozeß von Pflanzen eingreift (Frear 1976; Subramanian et al. 1997). Da 36DC2MBA überwiegend in dissoziierter Form in die Umwelt gebracht wird, zeichnet es sich durch eine hohe Mobilität aus und kann leicht aus dem Boden ausgewaschen werden, so daß sich 36DC2MBA im Grundwasser wiederfindet (Taraban et al. 1993). Erste Untersuchungen mit Bodenproben zeigten, daß der Abbau von 36DC2MBA im Boden durch Mikroorganismen erfolgen kann (Smith 1973; Smith 1974; Smith 1975). Bisher konnten 3 Reinkulturen, 2 Arten der Gattung *Pseudomonas* und ein Stamm der Gattung *Moraxella*, isoliert werden, die 36DC2MBA aerob mineralisieren können (Krueger et al. 1989). Auch ein anaerober Abbau von 36DC2MBA zu 6-Chlorsalicylat konnte durch ein Konsortium methanogener Bakterien nachgewiesen werden (Taraban et al. 1993).

Der Abbau von 36DC2MBA beginnt mit einer Demethylierung der 2-Methoxygruppe zu 3,6-Dichlorsalicylat (Smith 1973; Smith 1974; Smith 1975; Taraban et al. 1993; Weks et al. 1994; Yang et al. 1994; Wang 1995; Yang 1995). Diese Reaktion wird von einer 36DC2MBA-O-Demethylase katalysiert, die erstmals aus dem Stamm *Pseudomonas maltophilia* strain DI-6 kloniert werden konnte (Wang 1995). Dieser Multi-Enzym-Komplex besteht aus einer Reduktase, einem Ferredoxin und einer Oxygenase, die die NADH-abhängige Oxidation von 36DC2MBA katalysiert (Wang 1995). Eine O-Demethylase, die neben anderen methoxylierten aromatischen Verbindungen auch 36DC2MBA demethyliert, konnte außerdem in *Clostridium thermoaceticum* nachgewiesen werden (Subramanian et al. 1997). Im Gegensatz zur 36DC2MBA-O-Demethylase aus *Pseudomonas maltophilia* DI-6 benötigt diese Demethylase keine weiteren Co-Faktoren, wie z.B. Eisen oder ein Reduktionsäquivalent.

Ein kompletter Abbauweg für 36DC2MBA ist bisher noch nicht beschrieben worden. Untersuchungen mit radioaktiv markiertem $^{14}\text{CO}_2$ in unsterilem Boden konnten zeigen, daß 3,6-Dichlorsalicylat und 3,6-Dichlorgentisat als Produkte des 36DC2MBA-Abbaus entstehen (Krueger et al. 1991). Für den mikrobiellen Abbau von 36DC2MBA in einer Reinkultur schlagen Weeks et al. (in Subramanian et al. 1997) für den Stamm *Pseudomonas maltophilia* DI-6 einen hypothetischen Abbauweg von 36DC2MBA via 3,6-Dichlorsalicylat und 3,6-Dichlorgentisat vor, da dieser Stamm hohe Sauerstoffaufnahmeleistungen für Gentisat, aber keine für Brenzkatechin als Substrat zeigte. Dieser hypothetische Abbauweg für 36DC2MBA ist in Abbildung 2 dargestellt.

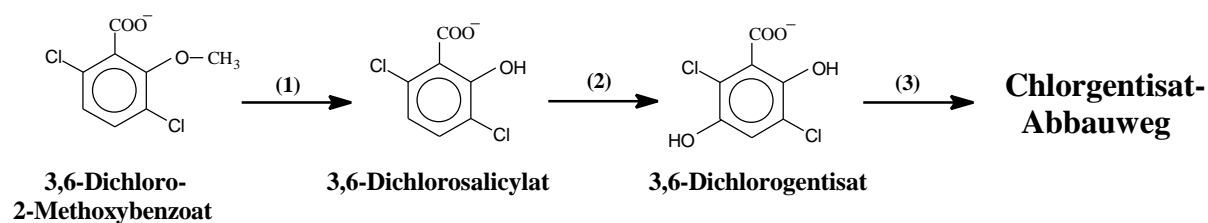


Abbildung 2: Hypothetischer Abbauweg von 36DC2MBA in unsterilem Boden nach KRUEGER et al. (1991). (1): 36DC2MBA-Demethylase; (2): Salicylat-5-Hydroxylase; (3): Gentisat-1,2-Dioxygenase

Der einzige bisher berichtete anaerobe Abbau von 36DC2MBA durch ein Konsortium aus einem sulfatreduzierenden, drei methanogenen und einem weiteren nicht identifizierten Organismus verlief ebenfalls über 3,6-Dichlorosalicylat als erstem Intermediat, das reduktiv zu 6-Chlorsalicylat dehalogeniert wurde (Taraban et al. 1993). Ein Abbau des aromatischen Ringes konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Der mikrobielle Abbau von 36DC2MBA ist bisher nur unzureichend charakterisiert worden. Neben dem Interesse für den mikrobiellen Abbau des Herbizids 36DC2MBA ist auch der Abbau von 3,6-Dichlorsalicylat, einem potentiellen Zwischenprodukt beim Abbau mehrkerniger chlorierter aromatischer Verbindungen, wie z.B. 1,4-Dichlornaphthalin oder 1,4-Dichlordibenzofuran, von Interesse.

Es konnte eine Reinkultur isoliert werden, die 36DC2MBA als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzt. In der hier vorliegenden Arbeit soll diese Bakterienkultur, Stamm RW5, identifiziert werden. Mittels verschiedener analytischer Verfahren soll ferner das Abbaupotential des Stammes RW5 beschrieben und ein Abbauweg für die Mineralisierung von 36DC2MBA vorgeschlagen werden.

Ein häufiges Problem des mikrobiellen Abbaus von Schadstoffen ist, daß einige Schadstoffe bisher nur unvollständig oder gar nicht abgebaut werden können oder das Substratspektrum von Mikroorganismen gegenüber verschiedenen Schadstoffen sehr begrenzt ist. Man ist daher daran interessiert, die Gene, die für die am Schadstoffabbau beteiligten Enzyme kodieren, zu identifizieren, zu charakterisieren und in sogenannten Genkassetten zur Verfügung zu stellen. Mit Hilfe dieser Genkassetten sollen neue, genetisch verbesserte, Mikroorganismen erzeugt werden, die dazu in der Lage sind, solche bisher nur unvollständig abbaubaren Schadstoffe oder Gemische von Schadstoffen vollständig abzubauen. Ein weiteres Ziel der hier vorliegenden Arbeit ist es deshalb, die korrespondierenden Gene der 36DC2MBA-Abbau-Enzyme zu identifizieren und zu charakterisieren.

2 Material und Methoden

2.1 Nährmedien, Puffer und Lösungen

Minimalmedium für Bakterien (Dorn 1974)

| | | |
|----------|--|------------|
| Lösung 1 | $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$ | 14 g |
| | KH_2PO_4 | 2 g |
| Lösung 2 | $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 0,5 g |
| | $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$ | 0,1 g |
| | $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 0,05 g |
| | $\text{Fe}^{2+}\text{NH}_4\text{-Citrat}$ | 0,02 g |
| | Spurenelementlösung SL6 | 0,1 ml |
| | destiliertes H_2O | ad 1000 ml |

Die Spurenelementlösung SL6 wurde nach Pfennig, 1966 bereitet. Lösung 2 wurde in 100-facher Konzentration angesetzt. Beide Lösungen wurden getrennt autoklaviert und nach dem Abkühlen im Verhältnis 100 : 1 gemischt. Der pH-Wert des fertigen Mediums betrug 7,3. Zur Bereitung fester Nährböden wurden dem Mineralmedium 15 g/l Purified Agar (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) zugesetzt. Die Kohlenstoffquellen wurden dem Mineralmedium steril und in Endkonzentrationen zwischen 1 mM und 10 mM zugesetzt.

Vollmedien für Bakterien nach Sambrook et al., 1989:

| | | |
|------------|-----------------|--------|
| LB-Medium: | (Bacto-)Trypton | 10 g/l |
| | Hefeextrakt | 5 g/l |
| | Natriumchlorid | 5 g/l |

Wenn notwendig wurden dem LB-Medium Antibiotika in geeigneter Konzentration zugesetzt (Tabelle 1).

Tabelle 1: Verwendete Antibiotika

| Antibiotikum | Stammlösung [mg/ml] | Lösungsmittel | Verwendete Enkonzentration [µg/ml] |
|-----------------|------------------------|---------------|---------------------------------------|
| Ampicillin | 100 | Wasser | 100 |
| Chloramphenicol | 25 | Ethanol | 25 |

2.2 Stämme und Plasmide, Herkunft und Stammhaltung

Der Stamm RW5 wurde aus einer Anreicherungskultur isoliert, die von aeroben Sedimenten des Flusses Elbe bei Hamburg, Stadtteil Blankenese, Teufelsbrück, ausging und die Zielverbindung 36DC2MBA als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle enthielt (WITTICH, persönliche Mitteilung). Andere Stämme, die in dieser Arbeit verwendet wurden, waren *E. coli* DH5α [*endA1*, *hsdR17* (r_k^- , m_k^+), *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *gyrA96*, *relA1*, *D(lacZYA-argFV169)*, *f80d lacZDM15*, F, *I*⁻] von Gibco BRL (Eggenstein) und *E. coli* BL21 [(DE3)[pLys] F *dcm ompT hsdS*($r_B^- m_B^-$) *galλ*(DE3)] von Clontech (Heidelberg). Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Plasmide

| Vektor | relevante Eigenschaften | Referenz |
|----------------------|---|---|
| pBluescript II SK(+) | Klonierungsvektor, Ap ^r | STRATAGENE, 1992 |
| pCR-Script SK (+) | Klonierungsvektor, Ap ^r | Invitrogen, 1992 |
| pCR2.1 | Klonierungsvektor, Ap ^r | Invitrogen, 1992 |
| pT7-5 | T7-Überexpressionsvektor, Ap ^r , Cm ^r | Stan Tabor, Harvard Medical School, Boston, USA |
| pT7-7 | T7-Überexpressionsvektor, Ap ^r , Cm ^r | Stan Tabor, Harvard Medical School, Boston, USA |
| pJW9 | pBluescript II SK(+) mit 6.631-bp | diese Arbeit |

| | | |
|---------|---|--------------|
| | <i>EcoRI</i> Fragment aus RW5 | |
| pJW23.2 | pCR-Script SK (+) mit 1.200-bp PCR-Produkt von RW5 | diese Arbeit |
| pJW39 | pBluescript II SK(+) mit 4.103-bp <i>SfuI</i> Fragment aus RW5 | diese Arbeit |
| pJW48 | pT7-7 mit 1,052-bp Fragment von <i>gtdA</i> | diese Arbeit |
| pJW50 | pCR-Script SK (+) mit ORF2 | diese Arbeit |
| pJW51 | pCR-Script SK (+) mit ORF3 | diese Arbeit |
| pJW54 | pT7-7 mit ORF2 | diese Arbeit |
| pJW55 | pT7-7 mit ORF3 | diese Arbeit |
| pJW56 | pCR-Script SK (+) mit ORF4 | diese Arbeit |
| pJW58 | pCR-Script SK (+) mit ORF2+3 | diese Arbeit |
| pJW61 | pT7-5 mit ORF4 | diese Arbeit |
| pJW63 | pT7-7 mit ORF2-3 | diese Arbeit |
| pJW64 | pT7-5 mit ORF2-4 | diese Arbeit |

Die Haltung des Stammes RW5 erfolgte auf Minimalmediumplatten mit 5 mM 36DC2MBA als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle, die für 2-3 Tage bei 30° C inkubiert und dann für 4 bis 8 Wochen bei 4° C gelagert wurden. Nach Ablauf dieser Zeit wurde der Stamm auf frische Platten überimpft. Während der gesamten Arbeitsphase wurden Flüssigkulturen mit der Zielverbindung als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle unterhalten, die alle sieben Tage in frisches Medium überimpft und auf einem Rotationsschüttler bei 30° C inkubiert wurden.

Zur Überprüfung des Reinheitsgrades der Kulturen wurden Flüssigkulturen auf eine Konzentration von ca. 10^3 Zellen/ml verdünnt, auf Kompletmedium ausgespatelt und bei 30° C inkubiert. Von einzelnen Kolonien wurden wiederholt Verdünnungsausstriche auf frischem Kompletmedium hergestellt und anhand ihres Koloniewachstums auf ihre Reinheit geprüft. Ferner wurden die Selektiv-Flüssigkulturen mikroskopisch auf eine homogene Zellmorphologie untersucht.

Rekombinante *E. coli* Zellen mit den Plasmiden pJW9 bis pJW64 wurden auf LB-Agarplatten mit den geeigneten Antibiotika gehalten und zusätzlich in 30% Glycerol bei -70° C gelagert.

2.3 Zellanzucht und Zellernte

Zur Zellanzucht in Flüssigmedium wurden Erlenmeyerkolben verwendet, die mit maximal 20% ihres Nennvolumens mit Mineralmedium gefüllt waren. Die Inkubation der Kulturen erfolgte bei 30° C oder für *E. coli* Zellen bei 37° C auf einem Rotationsschüttler bei 150 Upm. Das Inokulum betrug zwischen 1 % und 3 % der Vorkultur.

Zur Zellernte wurden die Kulturen in einer Kühlzentrifuge Typ RC-3 (Sorval Instruments, Wilmington, USA) bei 10000 Upm und 4° C für 15 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde zweimal mit 50mM Phosphatpuffer (pH 7,2) gewaschen, bevor die Zellen für weitere Versuche in einem jeweils geeigneten Puffer resuspendiert wurden.

2.4 Identifizierung des Stammes RW5

2.4.1 Identifizierung mit dem BIOLOG-Test

Zur taxonomischen Identifizierung von Bakterienstämmen wurde nach Feststellung des Gram-Verhaltens des Stammes (Nävecke 1982) ein Biolog-Test (BIOLOG, Hayward, CA, USA) durchgeführt. Als Vergleichsorganismen wurden ein *E. coli* und ein *Bacillus subtilis* Stamm analysiert (beide Vergleichsorganismen stammten aus der Stammsammlung des Institutes für Mikrobiologie der Technischen Universität Braunschweig).

Zur Durchführung des BIOLOG-Tests wurden bakterielle Zellsuspensionen (3×10^8 Zellen/ml) in 20 ml einer 0,85%igen NaCl-Lösung hergestellt. Mit einer Multikanal-Pipette wurden in jede Vertiefung einer BIOLOG-Mikrotiterplatte (Typ: BIOLOG GNMicroplate; Fa. BIOLOG) 150µl dieser Zellsuspension gefüllt und bei 30°C inkubiert. Nach 4h und 24h wurde das Ergebnis mit Hilfe eines ELISA-Readers (Modell 3550 Microplate-Reader, Bio-Rad, Richmond, USA) überprüft, wobei die Extinktion in jeder Vertiefung aufgrund einer Farbreaktion bei einer Wellenlänge von 595nm gegen einen Blindwert gemessen wurde. Nach 4 Stunden Inkubation wurden Extinktionswerte von $>0,15$ als "positiv" gewertet. Extinktionen zwischen 0,05 und 0,15 wurden als "Grenzwert" betrachtet. Nach 24 Stunden Inkubation wurden alle Vertiefungen mit einer Extinktion von $>0,5$ als "positiv" und mit einer Extinktion zwischen 0,35 und 0,45 als "Grenzwert" gewertet. Die Daten wurden in das Computerprogramm MICROLOG (BIOLOG) eingegeben und mit diesem ausgewertet.

2.4.2 Identifizierung durch Analyse der 16S rDNA Sequenz

2.4.2.1 Präparation genomischer DNA

Zur Präparation der genomischer DNA wurde eine Impföse frischen Zellmaterials des zu untersuchenden Stammes in 20µl sterilem MilliQ-Wasser resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde für 4 min bei 95° C auf einem Heizblock (Eppendorf, Hamburg) inkubiert und nach Abkühlung für 2 min bei 14000 Upm zentrifugiert. Von dem Überstand wurde 1 µl direkt in die PCR eingesetzt.

2.4.2.2 PCR-Amplifizierung der 16S rDNA

Die 16S rDNA wurde mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) in einem Thermocycler (Model 5.92, Landgraf, Langenhagen) amplifiziert (Saiki 1988).

Der dazu verwandte Vorwärts-Primer (16F27; 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') setzt an Position 8 - 27 (Zählung gemäß *E. coli*-Sequenz) an. Als Umkehr Primer wurde der Primer 16R1488 (5'-CGGTTACCTTGTTAGGACTTCACC-3'), der am komplementären Strang an der Position 1511 bis 1488 ansetzt, verwendet. Der Reaktionsansatz von 100 µl wurde mit 50 µl sterilem Mineralöl (USB, Cleveland, USA) überschichtet.

Der PCR-Ansatz bestand aus:

- 10 mM Tris HCl, pH 8,3
- 1,5 mM MgCl
- 50 mM KCl
- 0,1 mg/ml Gelantine
- 2 µl/ml Formamid
- je 200 µM der vier Desoxynucleosid-Triphosphate (dNTP)
- je 0,6 µM Primer
- 10 µg/ml der genomischen DNA
- 25 U/ml *Taq*-DNA-Polymerase (Fa. Promega, Heidelberg)

Die PCR wurde mit 30 Zyklen durchgeführt, die jeweils folgendermaßen gewählt wurden:

| Zyklus | Temperatur | Zeit | Vorgang |
|---------------|-------------------|-------------|------------------|
| 1 | 96° C | 60s | Denaturierung |
| 2 | 55° C | 60s | Primer Annealing |
| 3 | 72° C | 120s | Elongation |

Die Vervollständigung von Sequenzen, die in der Elongationsreaktion nicht in voller Länge amplifiziert wurden, erfolgte abschließend durch 10-minütige Inkubation bei 72° C.

2.4.2.3 Reinigung der amplifizierten DNA

Die Aufreinigung der amplifizierten DNA wurde mit Microcon Zentrifugen-Mikrokonzentratoren (No. 42412; Amicon, Beverly, USA) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Mit Hilfe einer anisotropen, hydrophilen "YM-Membran" konnten Moleküle niederen Molekulargewichtes (100.000 Dalton), d.h. überschüssige Primer, nicht inkorporierte dNTPs und Salze abgetrennt werden. Die Probe wurde in 100µl TE-Puffer aufgenommen; 3 µl davon wurden zur Überprüfung der PCR-Qualität mit einem 1-KB-Längen-Standard (Lambda DNA-Bst E II Digest, Biolabs GmbH, Schwalbach/Taunus) auf ein 0,8 %-iges Agarosegel aufgetragen.

2.4.2.4 Sequenzreaktion - Amplifikation der 16S rDNA-Fragmente

Zur Sequenzreaktion wurden Teilstücke des 16S rDNA Gens mit spezifischen Primern und fluoreszierend markierten Dideoxynukleotiden mittels PCR amplifiziert. Folgende Primer fanden dabei Anwendung:

| | |
|-----------|--------------------------------|
| 16 F 357 | 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3' |
| 16 R 518 | 5'-CGTATTACCGCGGCTGCTGG-3' |
| 16 F 704B | 5'-GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA-3' |
| 16 R 1087 | 5'-CTCGTTGCGGGACTTAACCC-3' |
| 16 R 1488 | 5'-CGGTTACCTTGTTACGACTTCACC-3' |

Der Reaktionsansatz enthielt in insgesamt 20 µl:

- 9,5 µl TerminatorPremix (PISM™ Ready Reaktion DyeDeoxy™ Terminator Cycle Sequencing Kit, No.401113, Applied Biosystems, Weiterstadt)
- 2,0 µl Primer (5µM)
- 8,5 µl Milli Q-Wasser und 16S rDNA-Fragment in unterschiedlichem Mischungsverhältnis

Der Reaktionsansatz wurde mit 40µl sterilem Mineralöl überschichtet. Im Thermocycler wurden 25 Zyklen gewählt. Ein Zyklus setzte sich wie folgt zusammen:

| Zyklus | Temperatur | Zeit | Vorgang |
|--------|---------------|------|------------------|
| 1 | 96° C | 15s | Denaturierung |
| 2 | 55 °C / 60° C | 15s | Primer Annealing |
| 3 | 55 °C / 60° C | 240s | Elongation |

Die Temperatur für das Primer Annealing und die Elongationsreaktion wurde je nach Auswahl der Primer festgelegt.

2.4.2.5 Aufreinigung der 16S rDNA-Fragmente

Zur Aufreinigung der PCR-Produkte wurde eine kombinierte Phenol/Chloroform-Extraktion mit einer Ethanol-Präzipitation angewendet. Die Versuchsdurchführung folgte dem Herstellerprotokoll (PISM™ Ready Reaktion DyeDeoxy™ Terminator Cycle Sequencing Kit Protocol, Part Number 401388, Seite 17).

2.4.2.6 Sequenzierungsreaktion

Die DNA wurde direkt in einem automatischen DNA-Sequenzer "Modell 373A" (Applied Biosystems) nach den Angaben des Herstellers sequenziert.

2.4.2.7 Analyse der 16S rDNA-Sequenzdaten

Die Analyse der Sequenzdaten erfolgte auf dem hauseigenen Großrechner "VAX" mit den Programmen GJO und SEQU. Die gewonnenen Sequenzdaten wurden dafür anhand bereits bekannter "Sequenzmasken" angeglichen, wobei konservative Regionen und Sekundärstrukturmerkmale der 16S rDNA zugrunde gelegt wurden (Woese 1983; Gutell et al. 1985). Die Daten wurden mit Sequenzen des 16S rDNA-Gens bekannter Organismen, die in einer hauseigenen Datenbank der Abteilung für Mikrobiologie, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, Braunschweig gespeichert waren, verglichen. Ähnlichkeitswerte und evolutive Abstände wurden unter Berücksichtigung eines Korrekturfaktors für reverse Mutationen ermittelt (Jukes 1969). Phylogenetische Stammbäume wurden nach der Methode von (Ollsen 1987) gebildet.

2.5 DNA-abhängige Techniken

Standard-Techniken, wie z.B. Restriktionsverdau, Ligation, Transformation, Agarosegelelektrophorese, etc. wurden entsprechend den Vorschriften von Sambrook et al. (Sambrook et al. 1989) durchgeführt. Plasmid-Präparationen für Sequenzreaktionen wurden mit dem Plasmid Maxi Kit oder mit dem Qiawell Ultra Kit nach Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt.

2.5.1 Präparation von Gesamt-DNA aus *Sphingomonaden*

Die Präparation von Gesamt-DNA wurde nach (Ausubel et al. 1994) durchgeführt. Hierzu wurden 1,5 - 5 ml einer Kultur 2 min bei 14000 rpm abzentrifugiert und der Überstand vollständig entfernt. Das Pellet wurde in 576 µl TE-Puffer vollständig resuspendiert, mit 30 µl 10% SDS und 3 µl Proteinase K (20 mg/ml) gemischt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 80 µl CTAB/NaCl (10% Hexadecyltrimethylammoniumbromid in 0,7 M NaCl) wurde erneut 10 min bei 65°C inkubiert. Durch Zugabe von 1 Vol Chloroform:Isoamylalkohol (24:1, vol:vol) und anschließender Zentrifugation (14000 rpm, 5 min, RT) wurde der DNA-haltige Überstand vom CTAB-Protein-Polysaccharid-Präzipitat getrennt. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und mit Phenol extrahiert. Die so gereinigte DNA wurde in 100 µl TE-Puffer aufgenommen.

2.5.2 Southern-Blot-Analyse

Hybridisierungen wurden in einem Hybridisierungssofen des Typs RPN2510 (Amersham, Buckinghamshire, UK) bei 68°C durchgeführt. Sonden wurden durch radioaktive Markierung mit [α -³²P]dCTP mittels des Megaprime DNA Markierungssystems (Amersham) hergestellt. Als Membranen wurden ungeladene Membranen des Typs Biodyne B (Pall, Glen Cove, NY, USA) oder Qiabran-Membranen (Qiagen, Hilden) genutzt.

2.5.3 DNA-Sequenzanalysen

Zur Sequenzierung von DNA wurde beide Stränge analysiert (siehe 2.4.2.6). Die Sequenzen wurden mittels des Programs GeneWorks software package V2.51 (IntelliGenetics, Mountain View, CA, USA) bearbeitet. Für initiale Ähnlichkeitsuntersuchungen wurden die Großrechneranlagen des European Molecular Biology Laboratory (EMBL, Heidelberg, Germany) und des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA) genutzt. Sequenzvergleiche, die Kalkulation von evolutiven Abständen und das Erstellen von phylogenetischen Verwandtschaftsbäumen wurden mit der GeneWorks software (IntelliGenetics) und dem Phylips programs package, das mir freundlicherweise von Herrn Dr. Armengaud (GBF, Braunschweig) zur Verfügung gestellt wurde, durchgeführt.

2.5.4 Klonierung des Gens für die Gentisinsäure-1,2-Dioxygenase

Zur Klonierung des GDO Gens wurden zwei degenerierte Oligonukleotidprime konstruiert, deren Nukleotidsequenz unter Berücksichtigung der möglichst niedrigsten Redundanz auf den Ergebnissen der Aminosäuresequenzierung der aus dem Stamm RW5 aufgereinigten GDO basierten. Die Primer wurden in einer PCR unter gering stringenten Bedingungen (37° C) mit Gesamt DNA des Stammes RW5 als Vorlage eingesetzt. Die Nukleotidsequenz des aus der PCR resultierenden 1,2 kb Produktes beinhaltete die bereits bekannte Sequenz für den Aminoterminal der GDO. Das PCR-Produkt wurde in den pCR-Script SK (+) Vektor kloniert und als Sonde für Hybridisierungs-Experimente eingesetzt. Southern blots mit *SfuI*-verdauter DNA des Stammes RW5 wurden mit dieser Sonde unter stringenten Bedingungen durchgeführt und Signale auf Biomax MR X-ray Filmen (Kodak, Rochester, NY, USA) analysiert.

Zur Konstruktion einer partiellen Mini-Plasmid Genbank des Stammes RW5 wurde *SfuI*-verdaute Gesamt-DNA des Stammes elektrophoretisch aufgetrennt und ein Agarosegelstück, das DNA Fragmente mit einer Größe von 3,5 bis 5,0 kb enthielt, aus dem Gel ausgeschnitten. Die DNA wurde aus dem Gel elektroeluiert, mit Calf Intestine Phosphatase dephosphoryliert und in einen *AccI*-verdauten pBluescript II KS (+) Vektor ligiert. Die resultierenden

Hybridplasmide wurden in elektrokompente *E. coli* DH5 α -Zellen transformiert und auf LB-Platten mit 1.0 mM IPTG, 0.004% X-gal, und 0.1 mg/ml Ampicillin vereinzelt. Koloniehybridisierungen wurden mit der PCR-generierten Gensonde durchgeführt und Kolonien mit den stärksten positiven Signalen weiter analysiert.

2.5.5 Klonierung der Upstream Region des Gens für die Gentisinsäure-1,2-Dioxygenase

Zur Klonierung der upstream Region des GDO-Gens wurde eine weitere partielle Mini-Plasmid Genbank des Stammes RW5 angelegt. Hierzu wurde *EcoRI*-verdaute Gesamt DNA des Stammes elektrophoretisch aufgetrennt und ein Agarosegelstück, das DNA-Fragmente mit einer Größe von 6,0 bis 7,5 kb enthielt, aus dem Gel ausgeschnitten. Die DNA wurde aus dem Gel elektroeluiert, mit Calf Intestine Phosphatase dephosphoryliert und in einen *EcoRI*-verdauten pBluescript II KS (+) Vektor ligiert. Die resultierenden Hybridplasmide wurden in elektrokompente *E. coli* DH5 α -Zellen transformiert und auf LB-Platten mit 0.004 % X-gal, und 0.1 mg/ml Ampicillin vereinzelt. Koloniehybridisierungen wurden mit der PCR-generierten Gensonde durchgeführt und Kolonien mit den stärksten positiven Signalen weiter analysiert.

2.5.6 Überexpression klonierter Gene

Zur Überexpression von klonierten Genen wurden zwei synthetische Oligonukleotidprimer konstruiert, von denen einer eine künstliche *NdeI* Restriktionsschnittstelle am Startkodon und ein zweiter eine künstlichen *BamHI* Restriktionsschnittstelle am Stopkodon des zu überexprimierenden Gens einfügte. Abweichend davon wurden für zu überexprimierende Gene, die eine interne *NdeI* Restriktionsschnittstelle besaßen, synthetische Oligonukleotidprimer konstruiert, die eine künstliche *EcoRI* Restriktionsschnittstelle hatten. Diese Primer setzten ca. 40 Basenpaare oberhalb des Startkodons an und amplifizierten so die natürliche Shine-Delgarno-Sequenz des Gens mit. Die Primer wurden mit DNA von Plasmiden, die die rekombinanten Gene trugen, als Vorlage in einer PCR eingesetzt, bei der zur Vermeidung von Fehlinkorporationen eine sog. „proofreading“ Polymerase (*VENT* Polymerase; New England Biolabs, Beverly, USA) verwendet wurde. Die resultierenden DNA-Fragmente wurde in einen pCR-Script SK (+) Vektor kloniert, dessen Insert zur

Überprüfung auf mögliche falsch inkorporierte Nukleotide resequenziert wurde. Die *NdeI*-*BamHI* Fragmente bzw. *EcoRI*-*BamHI* Fragmente wurden anschließend mit *NdeI* und *BamHI* bzw. *EcoRI* und *BamHI* verdaut und isoliert. Das resultierende DNA-Fragment wurde in einen mit *NdeI*- und *BamHI*-vorverdauten Überexpressionsvektor pT7-7 bzw. in einen *EcoRI*- und *BamHI*-vorverdauten Überexpressionsvektor pT7-5 ligiert. Die Überexpression der rekombinanten Gene wurde in *E.coli* BL21 (DE3) durch Induktion mit 0.4 mM IPTG durchgeführt.

2.6 Untersuchungen zum Wachstum

Die Bestimmung des Wachstums von Stämmen mit der Zielverbindung wurde durch Parameter wie der Optischen Dichte (OD), der Gesamtzellzahl, der Substrat- und Produktkonzentration sowie der Chloridkonzentration während einer Kultivierung verfolgt. Zusätzlich wurden mögliche Kulturmetabolite aus dem Kulturüberstand extrahiert und identifiziert.

2.6.1 Messung der Optischen Dichte (OD)

Das Bakterienwachstum wurde durch Messung der Trübung (OD_{600}) in einem Spektralphotometer (DU-70, Beckmann Instruments Inc., Berkley, CA, USA) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 600$ nm und einer Schichtdicke von 1 cm gemessen. Zum Null-Abgleich diente die jeweilige unbeimpfte Mineralsalzlösung. Eine Verdünnung der Proben wurde vorgenommen, wenn die OD über einem Wert von 0,3 lag.

2.6.2 Gesamtzellzahlbestimmung in der THOMA-Kammer

Die Gesamtzellzahl von Mikroorganismen wurde in einer Zählkammer nach THOMA mit einer Fläche von $0,0025 \text{ mm}^2$ und einer Tiefe von 0,02 mm ermittelt. Pro Probe wurden 100 Kleinquadrate ausgezählt und das Ergebnis gemittelt (Nävecke 1982).

2.6.3 Messung der Substrat- und Produktkonzentrationen

Die Abnahme des Substrats, bzw. die Zunahme von entstehenden Produkten wurde mittels analytischer HPLC (siehe 2.10.3) gemessen. Die Biomasse der Proben wurde nach Zentrifugation mit einem Sterilfilter (Typ Minisart SRP25, Fa. Sartorius AG, Göttingen) abfiltriert, um die HPLC-Säule nicht zu verunreinigen.

Zur Berechnung der Konzentration von Substraten und Produkten wurde eine Eichgerade erstellt. Für Produkte erfolgte dies, nachdem deren Struktur und Masse mittels chromatographischer und spektroskopischer Verfahren identifiziert war.

2.6.4 Messung der Chlorid-Konzentration

Die Konzentration freier Chloridionen wurde mit einer Chloridsensor-Durchflußzelle (M. Otto, Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik, Stuttgart) ermittelt. Aufgrund des linearen Meßbereiches der Elektrode zwischen 1 und 250 μM wurden alle Proben mit 50 mM Acetatpuffer (pH 5,0) auf diesen Meßbereich verdünnt. Die Proben wurden mit dem Gilson 231XL Autoinjektionssystem (Bezug: Abimed, Langenfeld, Deutschland) in die Durchflußzelle injiziert. Zur Kalibrierung der Elektrode wurde vor jeder Messung eine Eichgerade im linearen Bereich mit einer NaCl-Lösung unterschiedlicher Konzentrationen zwischen 5 μM bis 150 μM im 50 mM Acetatpuffer (pH 5,0) erstellt.

2.6.5 Isolierung von Metaboliten aus Kulturüberständen

Die Isolierung von Metaboliten erfolgte direkt aus dem Kulturüberstand nach Anzucht auf der jeweiligen Zielverbindung. Zellfreie Kulturüberstände wurden durch Zentrifugation für 20 min bei 12000 Upm in einer Kühltzentrifuge und anschließender Filtration des Überstandes ($\varnothing = 0,22 \mu\text{m}$) gewonnen. Nach Einstellung mit konzentrierter Salzsäure auf einen pH-Wert von 2 wurden die Überstände dreifach mit Ethylacetat ausgeschüttelt und die organische Phase über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Diese wurde in einem Rotationsverdampfer (Modell Rotavapor R, Fa. Büchi, Schweiz) bei 30° C und einem Druck von 150 hPa eingengt und der Rückstand in 2 ml Methanol aufgenommen. Dieser wurde mittels präparativer HPLC

aufgetrennt und die Fraktionen mittels analytischer HPLC auf Reinheit überprüft. Die erhaltenen Fraktionen bestanden aus einem angesäuerten Methanol-Wasser-Gemisch. Die Substanzen wurden zur weiteren Analyse erneut mit Ethylacetat extrahiert, getrocknet und eingeeengt. Die reine Substanz konnte mittels analytischer HPLC (siehe 2.10.3) oder nach Derivatisierung mittels GC-MS (siehe 2.10.1) analysiert werden.

2.7 Messung der Sauerstoffaufnahme von Zellsuspensionen

Die Messung des Sauerstoffverbrauches durch Zellsuspensionen wurde polarographisch mit einer Sauerstoffelektrodeneinheit bei 25° C durchgeführt und aufgezeichnet:

| | |
|-------------------------|--|
| Sauerstoffelektrode | Fa. Hansatech LTD, Kings Lynn, England |
| Control box CB1D, | Fa. Hansatech |
| Wasserbad DL, | Fa. Haake, Karlsruhe |
| Wasserbad-Steuerung D1, | Fa. Haake |
| Schreiber SERVOGOR 120 | Fa. Görtz-Metrawatt, Österreich; Bezug: Fa. Bachofer, Reutlingen) |

Die Eichung der Elektrode erfolgte über die Einstellung des Nullwertes nach Zugabe einiger Kristalle des Reduktionsmittels Natriumdithionit. Bei 25° C beträgt die maximale Sauerstoffkonzentration in Wasser 0,253 $\mu\text{mole O}_2/\text{ml}$.

Zur Bestimmung der Sauerstoffaufnahme von Zellen wurden die Zellen mit unterschiedlichen Substraten kultiviert, in der spätexponentiellen bzw. spätlinearen Phase geerntet, zweimal mit 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,2) gewaschen, resuspendiert und auf eine OD₆₀₀ von 5,0 eingestellt. In der Meßzelle der Sauerstoffelektrode (Volumen: 1ml) wurde die Zellsuspension mit Phosphatpuffer (50mM, pH 7,2) auf eine OD von 0,75 oder 1,0 verdünnt. Das eingefüllte Volumen betrug 990 μl . Nach Verschuß der Meßkammer wurde die endogene Atmung aufgezeichnet. Das jeweilige Substrat wurde in einer Endkonzentration von 1 mM in der Meßzelle eingesetzt. Dazu wurden 10 μl einer 100 mM Stammlösung (gelöst in DMSO bzw. MilliQ) mit einer Hamilton-Spritze (Hamilton, Bonaduz, Schweiz) in die Meßzelle injiziert. Die erhaltenen Meßwerte wurden jeweils um den Wert der endogenen Atmung korrigiert.

2.8 Proteinbiochemische Methoden

2.8.1 Herstellung zellfreier Extrakte

Zur Herstellung von Flüssigkulturen wurden Zellen bis zur mittleren exponentiellen Wachstumsphase angezogen und bei 13.000 x g abzentrifugiert, dreifach in 20 mM Tris-HCl Puffer (pH 7.0) gewaschen und in 3 ml desselben Puffers resuspendiert. Der Zellaufschluß erfolgte mittels Passage durch eine vorgekühlte French-Pess-Zelle (Aminco, Silver Spring, USA) bei einem Druck von 76 MPa. Ganze Zellen, Zelltrümmer und unlösliche Proteine wurden durch Ultrazentrifugation für 30 min bei 35000 UpM und 4°C entfernt und der Überstand wurde sofort für enzymatische Messungen bzw. für die Enzymbereinigung eingesetzt. Zellfreie Extrakte von *E. coli* BL21 (DE3) Zellen mit dem Plasmid pJW48 wurden nach Induktion mit 0.4 mM IPTG durch die „freeze-thaw Methode“ (Armengaud und Jouanneau 1995)

2.8.2 Bestimmung von Proteingehalten

Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte modifiziert nach der Methode von BRADFORD (1976) mit Rinderserumalbumin (BSA) als Standardprotein. Wenn nicht anders beschrieben, so wurde jede Messung in Dreifachbestimmung durchgeführt. Die zu bestimmende Proteinlösung wurde mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 800 µl verdünnt. Dazu wurden 200 µl Bradford-Reagenz (BioRad, Richmond, USA) gegeben und durchmischt. Nach 10 min Reaktionszeit bei Raumtemperatur erfolgte die Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von $\lambda = 595$ nm im Spektrophotometer (DU-70, Beckmann Instruments Inc., Berkley, USA). Das Ergebnis wurde nachträglich rechnerisch um den Blindwert korrigiert. Dieser wurde aus 800 µl der Zellsuspension mit einer Optischen Dichte (E_{600}) von 5 und 200 µl Bradford-Reagenz ermittelt, um sicherzustellen, daß etwaige Reste von Ampicillin oder Lysozym den Meßwert nicht verfälschten.

Der Proteingehalt wurde aus den Extinktionsmeßwerten durch Berechnung mit der Geradengleichung einer Kalibriergeraden ermittelt. Die Kalibriergerade wurde aus Meßwerten einer seriellen Verdünnung mit eingewogenem Rinderserum-Albumin (BSA) durch lineare Regression ermittelt und für alle Proteinbestimmungen verwendet.

2.8.3 Bestimmung von Enzymaktivitäten

Eine Enzymeinheit [1 Unit = 1 U] entspricht der Enzymaktivität, die den Umsatz von 1 μmol Substrat pro min bei 25° C katalysiert. Die spezifische Aktivität wurde immer bezogen auf den Proteingehalt in Unit pro mg Protein [U/mg] angegeben.

Die kinetischen Parameter K_m und V_{\max} wurden mit dem Programm SigmaPlot (Jandel Scientific, Erkrath) mittels nicht-linearer Regression berechnet. Als Maß für die Enzymspezifität wurde der Quotient (K_{cat} / K_m) aus der maximalen Wechselzahl und der Michaelis-Konstanten ermittelt [$\text{s}^{-1}\text{M}^{-1} \times 10^4$].

2.8.3.1 Salicylat-1-Hydroxylase (E.C.1.14.13.1)

Die Bestimmung der Aktivität der Salicylat-1-Hydroxylase erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm. Der Nachweistest basierte auf der Oxidation von NADH zu NAD^+ . Der Ansatz hatte folgende Zusammensetzung:

| | |
|----------------------|-------------------------|
| 50,0 μmol | Tris/HCl-Puffer, pH 8,0 |
| 100 μmol | Natriumsalicylat |
| 100 μmol | NADH |
| 1 μmol | EDTA |
| 2-20 μl | Rohextrakt |

Der Extinktionskoeffizient des gebildeten Konjugats beträgt $\epsilon = 6230 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Banat et al. 1992). Vor Beginn der Messung wurde der NADH-Verbrauch des zellfreien Extraktes gemessen und von den Ergebnissen abgezogen.

2.8.3.2 Salicylat-5-Hydroxylase

Salicylat wird durch die Salicylat-5-Hydroxylase zu Gentisat umgesetzt. Im Enzymtest wird der Umsatz von Salicylat mittels analytischer HPLC durch Abnahme von Salicylat und Zunahme von Gentisat verfolgt. Ein Ansatz hatte folgende Zusammensetzung (Grund 1992) :

| | |
|-------------|---|
| 1,5-1,9 ml | 20 mM K-Phosphat-Puffer, pH 8,0; 50 mM Dithiothreitol |
| 750 μ l | 10 mM α,α -Dipyridyl |
| 30 μ l | 100 mM MnSO_4 |
| 30 μ l | 100 mM ZnSO_4 |
| 150 μ l | NADPH |
| 30 μ l | 36 mM ATP |
| 30 μ l | 6,5 mM CoA |
| 150 μ l | 10 mM Na-Salicylat |
| 0,1-0,5 ml | Rohextrakt |

2.8.3.3 Brenzkatechin-1,2-Dioxygenase (E.C.1.13.11.1)

Brenzkatechin wird durch die Brenzkatechin-1,2-Dioxygenase zu *cis,cis*-Muconsäure umgesetzt. Im Enzymtest wurde die Produktbildung bei $\lambda = 260$ nm gemessen. Der molare Extinktionskoeffizient von *cis,cis*-Muconsäure beträgt nach Dorn und Knackmuss bei dieser Wellenlänge $\epsilon = 16800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Dorn und Knackmuss 1978a).

Modifiziert nach Hegemann enthielten die Reaktionsansätze in 1 ml (Hegemann 1966):

| | |
|----------------|---|
| 33,0 μ mol | Tris/HCl-Puffer, pH 8,0 |
| 1,3 μ mol | EDTA |
| 0,5 μ mol | Brenzkatechin oder ein chloriertes Dervivat |
| 2-20 μ l | Rohextrakt |

2.8.3.4 Brenzkatechin-2,3-Dioxygenase (E.C.1.13.11.2)

Brenzkatechin wird durch die Brenzkatechin-2,3-Dioxygenase zu 2-Hydroxymuconsäure umgesetzt. Im Enzymtest wurde die Produktbildung bei $\lambda = 375$ nm gemessen. Der molare Extinktionskoeffizient von 2-Hydroxymuconsäure beträgt nach Nozaki bei dieser Wellenlänge $\epsilon = 67800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Nozaki 1973).

Der Reaktionsansatz enthält in 1 ml:

| | |
|----------------------|---|
| 33,0 μmol | Tris/HCl-Puffer, pH 8,0 |
| 0,2 μmol | Brenzkatechin oder ein chloriertes Dervivat |
| 2-20 μl | Rohextrakt |

2.8.3.5 *Gentisinsäure-1,2-Dioxygenase (EC 1.13.11.4)*

Gentisinsäure wird durch die Gentisinsäure-1,2-Dioxygenase zu Maleylpyruvat umgesetzt. Im Enzymtest wird die Produktzunahme bei $\lambda = 340\text{nm}$ von Maleylpyruvat und bei $\lambda=361\text{nm}$ von 3,6-Dichlormaleylpyruvat photometrisch bestimmt. Der molare Extinktionskoeffizient für Maleylpyruvat war $\epsilon=10.200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Wheelis et al. 1967) und wurde für 3,6-Dichlormaleylpyruvat mit $\epsilon=6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ermittelt.

Die Reaktionsansätze enthielten nach (Wheelis et al. 1967):

| | |
|---------------------|---|
| 94 μmol | Tris-HCl-Puffer (pH: 8,0) |
| 3-10 μl | Rohextrakt |
| 0,2 μmol | $\text{FeSO}_4 (*2\text{H}_2\text{O})$ |
| 0,2 μmol | Gentisinsäure oder 3,6-Dichlorgentisinsäure |

2.8.3.6 *Glutathion-S-Transferase (EC 2.5.1.18)*

Die Bestimmung der Aktivität der Glutathion-S-Transferase erfolgte photometrisch (Habig und Jakoby 1981). Der Nachweistest erfolgte auf der Bildung eines Konjugats zwischen reduziertem Glutathion und 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (CDNB). CDNB gilt als nahezu universelles Substrat aller GSTs mit sehr hoher Affinität. Messungen wurden bei einer Wellenlänge von 340 nm durchgeführt. Der Ansatz hatte folgende Zusammensetzung:

| | |
|--------------------|--|
| 600 μl | 0,1 M K- PO_4 -Puffer (pH: 6,5) |
| 3-10 μl | Rohextrakt |
| 6,0 μl | 0,1 M reduziertes Glutathion |
| 6,0 μl | CDNB |

Der Extinktionskoeffizient des gebildeten Konjugats beträgt $9600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Habig und Jakoby 1981). Die nichtenzymatische Aktivität wurde durch einen Ansatz ohne Rohextrakt berechnet und von der enzymatischen Aktivität subtrahiert.

2.8.3.7 Maleylpyruvat-Isomerase / Umsatz von Maleylpyruvat

Maleylpyruvat wurde durch Oxidation von Gentisat mit zellfreiem Extrakt von induzierten Zellen des Stammes *E. coli* BL21 (DE3) pJW48 hergestellt, der das Plasmid mit dem Gen für die klonierte und überexprimierte GDO enthält.

Der Umsatz von Maleylpyruvat erfolgte mit zellfreien Extrakten. Hierzu wurde die Abnahme der Extinktion von Maleylpyruvat photometrisch bei $\lambda = 340 \text{ nm}$ (Wheelis et al. 1967; Hagedorn und Chapman 1985). Zusätzlich wurde die Abnahme von Maleylpyruvat sowie die Bildung von dessen Abbauprodukten mittels analytischer HPLC gemessen. Die HPLC-Analyse wurde mit einer Säule vom Typ ODS II mit einem Fließmittel aus $0,1^{0/00} \text{ H}_3\text{PO}_4$ (v/v) in dest. Wasser durchgeführt. Nach vollständigen Umsatz von Gentisat zu Maleylpyruvat wurde dem Reaktionsansatz $0,2 \text{ mmol}$ reduziertes Gluthathion zugegeben und die Reaktion durch die Zugabe von 2 bis $20 \mu\text{l}$ zellfreien Extrakts des Stammes RW5 gestartet. Der Reaktionsansatz enthielt:

| | |
|---------------------|--|
| 94 μmol | Tris-HCl-Puffer (pH: 8,0) |
| 3-10 μl | Rohextrakt <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pJW48 |
| 0,2 μmol | FeSO_4 |
| 0,2 μmol | Gentisat |
| 0,2 μmol | reduziertes Gluthathion |
| 2-20 μl | Rohextrakt RW5 |

2.8.4 Proteinaufreinigung

Alle chromatographischen Enzymanreicherungen wurden bei 4°C mit der schnellen Protein- und Polypeptid-Flüssig-Chromatographie (FPLC) der Firma Pharmacia, Uppsala, Schweden mit folgenden Geräten durchgeführt:

| | |
|---------------------|---------------------------------|
| Kontrolleinheit | Typ LCC 500 Plus |
| zwei Pumpen (A,B) | Typ P 500 |
| Motorventil | Typ MV-7 |
| UV-Detektor | Typ UV-M II (Durchflußdetektor) |
| Zweikanal-Schreiber | Typ REC 102 |
| Fraktionssammler | Typ FRAC-100 |

Mit den beiden Pumpen konnten lineare Gradienten aus zwei Fließmitteln (A,B) hergestellt werden. Die Trennung wurde durch Messung des Proteingehalts des Eluats (Durchflußmessung bei $\lambda = 280 \text{ nm}$) verfolgt. Es wurden 0,5 ml oder 1,5 ml Fraktionen aufgefangen. Um eine Verunreinigung der Trennsäule zu vermeiden, wurden die Fließmittel unter Wasserstrahlpumpen-Vakuum sterilfiltriert ($0,22 \text{ }\mu\text{m}$). Dadurch wurden gelöste Gase aus dem Fließmittel weitgehend entfernt.

2.8.4.1 Anionen-Austauschchromatographie (I)

Verwendete Trennsäule: DEAE-Sepharose.

Das Trennmateriale der Säule besteht aus einem hydrophilen Kunsthharz in Perlenform (Durchmesser ca. $10 \text{ }\mu\text{m}$) mit quarternären Aminogruppen ($\text{R-CH}_3\text{-N}^+(\text{CH}_3)_3$) als funktionellen Anionenaustauschern. Das Trennprinzip beruht auf der unterschiedlichen Neigung der Proteine, mit den quarternären Aminogruppen eine ionische Wechselwirkungen einzugehen. Die Proteine binden am Säulenmaterial und werden erst durch steigende Anionenkonzentration (Cl^-) im Eluenten wieder abgelöst (Austauschvorgang).

Die DEAE-Sepharose-Säule wurde nach Herstellerangaben (Pharmacia) gepackt und mit 20mM Tris-HCl Puffer, pH 7.0 (Puffer A) äquilibriert. Zelleextrakte wurden auf die Säule gegeben und mit einem linearen Gradienten von 0-1 M NaCl in Puffer A eluiert. Die Fraktionen wurden auf GDO-Aktivität untersucht, aktive Fraktionen gesammelt und mittels des Centriprep-30 Systems (Amicon Inc., Beverly, MA., USA) auf ein Volumen von weniger als 1 ml aufkonzentriert.

2.8.4.2 Anionen-Austauschchromatographie (II)

Verwendete Trennsäule: MonoQ HR 10/10.

Das Trennmaterial der Säule besteht wie bei der DEAE-Sepharose aus einem hydrophilen Kunstharz in Perlenform (Durchmesser ca. 10 μm) mit quarternären Aminogruppen ($\text{R-CH}_3\text{-N}^+(\text{CH}_3)_3$) als funktionellen Anionenaustauschern.

Die MonoQ HR 10/10 Säule wurde mit Puffer A äquilibriert und die von der DEAE Sepharose Säule gesammelten, aktiven Fraktionen wurde auf die Säule aufgetragen. Die Elution der Proteine erfolgte mit NaCl in Puffer A: zunächst mit einem 40 ml linearen 0 - 0,25 M Gradienten, dann mit einem 160 ml linearen 0,25 - 0,35 M Gradienten und schließlich mit 40 ml 1M NaCl in Puffer A. Aktive Fraktionen wurden mit dem Centriprep-30 System auf ein Volumen von weniger als 1 ml aufkonzentriert.

2.8.4.3 Gelfiltration

Verwendete Trennsäule: HiLoad 26/60 Superdex® 200 pg.

Das Trenngel besteht aus einem mit Phenylgruppen quervernetzten Medium auf Agarose-Basis mit einem Gelperlendurchmesser von $34(\pm 10)$ μm . Proteine werden bei dieser Methode nach ihrem Molekulargewicht voneinander getrennt (negativer Molekularsiebeffekt).

Die Superdex 200 Säule wurde mit 50 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,0) mit 100 mM NaCl äquilibriert und die Proteine bei einer Flußrate von 0,5 ml/min mit demselben Puffer eluiert. Aktive Fraktionen wurden gesammelt und für weitere Untersuchungen eingesetzt.

2.9 Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen

2.9.1.1 Größenbestimmung denaturierter Proteine mittels SDS-Gelelektrophorese

Zur Reinheitsüberprüfung von Proteinpräparationen sowie zur Bestimmung der molaren Masse von denaturiertem Protein wurde ein SDS-Polyacrylamidgel verwendet (Laemmli 1970).

| | | |
|---------------|--------|---|
| Sammelgel: | 125 mM | Tris-HCl, pH 6,8 |
| | 5% | Acrylamid/N,N-Methylbisacrylamid (Fa. Roth) |
| | 0.2% | TEMED |
| | 0,04% | Ammoniumpersulfat |
| Trenngel: | 375 mM | Tris-HCl, pH 8,8 |
| | 10% | Acrylamid/N,N-Methylbisacrylamid (Fa. Roth) |
| | 0.2% | TEMED |
| | 0,04% | Ammoniumpersulfat |
| Laufpuffer: | 25 mM | Tris-Base |
| | 192 mM | Glycin |
| | 2 mM | EDTA |
| | 0.1% | SDS |
| Probenpuffer: | 20% | Glycerin |
| | 3% | SDS |
| | 3% | β -Mercaptoethanol |
| | 10 mM | EDTA |
| | 0,05% | Bromphenolblau |

Für die Elektrophorese wurden folgende Geräte verwendet:

Gießstand/Elektro-Mini-Protean II Dual Slab-Apparatur (Firma Bio-Rad, Richmond, USA).

Spannungsquelle: Stabilisiertes Netzgerät 300 V, 0,4 A (Firma Bachhofer, Reutlingen).

Die Dimension des Gels betrug 10 cm x 10 cm x 0.75mm (H x B x T). Zuerst wurde das Trenngel gegossen und mit Ethanol überschichtet, um eine gerade Oberfläche zu bekommen. Nach der Polymerisation wurde das Ethanol entfernt und das Sammelgel darübergeschichtet. Alle Proben und Standards wurden im Verhältnis 1:1 mit doppelt konzentriertem Probenpuffer verdünnt und im Thermoblock für 3 min bei 95°C erhitzt und nach Abkühlung mit einer Hamilton-Spritze aufgetragen. Für die elektrophoretische Trennung wurde eine Spannung von 100 oder 150 V angelegt. Die Proteine wurden anschließend mit Coomassie Brilliant Blue G250 (0.1% in 10% Methanol, 10% Eisessig) angefärbt. Als Molekulargewichtsstandard wurde der SDS-Page Mol. Weight Standards Low Range (Bio-Rad, Richmond, USA) als Proteinstandard eingesetzt:

| | |
|------------------------------|-----------|
| Phosphorylase B (Kaninchen) | 97.400 Da |
| Rinderserumalbumin | 66.200 Da |
| Albumin (Hühnerei) | 45.000 Da |
| Carboanhydrase (Rind) | 31.000 Da |
| Trypsininhibitor (Soyabohne) | 21.500 Da |
| Lysozym (Hühnerei) | 14.400 Da |

2.9.1.2 Größenbestimmung nativer Proteine

Die molekulare Masse nativer Proteine wurde mittels Gelfiltration auf einer vorgepackten HiLoad 26/60 Superdex® 200 pg Säule (Pharmacia) abgeschätzt. Als Standards dienten Ferritin (440,000 Da), Katalase (232,000 Da), Aldolase (158,000 Da), Rinderserumalbumin Albumin (67,000 Da), Ovalbumin (43,000 Da), und Chymotrypsin A (25,000 Da) (alle von Pharmacia).

2.9.2 *N-terminale Aminosäuresequenzanalyse*

2.9.2.1 *Halbtrockenes Protein-Blot-Verfahren*

Zur Sequenzierung des N-Terminus von Proteinen wurde ein Elektro-Blot durchgeführt, um die Proteine von noch vorhandenen Verunreinigungen aus den vorangegangenen Aufreinigungsschritten zu trennen. Hierzu wurde das aufkonzentrierte Protein auf einem präparativen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend ungefärbt für den Blot eingesetzt. Dieser erfolgte auf eine ProBlott™-Membran der Firma Applied Biosystems in einer „Semi-Dry-Blot-Kammer“ (Phase, Lübeck, Deutschland). Auf die Glasgraphitanode wurde aufgelegt: 2 Lagen in Blotpuffer getränktes Whatmanpapier, in Blotpuffer inkubiertes SDS-Gel, die ProBlott™-Membran (1 min in Methanol und 5 min in Blotpuffer getränkt), 2 Lagen in Blotpuffer getränktes Whatmanpapier und schließlich die Edelstahlkathode. Der Blot wurde bei 120 mA und Raumtemperatur über 70 min durchgeführt. Die Membran wurde nach dem Blot zweimal mit MilliQ-Wasser gewaschen, für einige Sekunden in 100% Methanol gesättigt und für 60 s mit 0.1% Coomassie® Blue R-250 in 40% Methanol und 1% Eisessig gefärbt und in 50% Methanol wieder entfärbt. Die betreffende Bande wurde ausgeschnitten und 3-fach in MilliQ-Wasser gewaschen.

Blotpuffer (pH: 8.3):

| | |
|--------|-----------------------------|
| 78 mM | Glycin |
| 96 mM | Tris Base |
| 0.074% | SDS (electrophoresis grade) |
| 20% | Methanol |

2.9.2.2 *Lys-C-Verdau von Proteinen*

Um interne Sequenzen von Proteinen zu erhalten, wurde ein *In situ* Verdau auf der Membran mit der Endoproteinase Lys-C (Promega, Heidelberg, Germany) in 100 mM Ammoniumbicarbonat, 10% Acetonitrile und 0.5% Octylglucosid durchgeführt. Erhaltene Proteinfragmente wurden mittels HPLC (Modell Applied Biosystems 172A, Applied

Biosystems) mit einer Aquapore OD-300 C18 Säule (1.0mm x 100mm) in einem Gradienten von 5% bis 60% Acetonitril in 0.05% Trifluoressigsäure getrennt. Peptidfraktionen wurden manuell gesammelt und anschließend direkt sequenziert.

2.9.2.3 Sequenzierungsreaktion der Aminosäuresequenz

Die Sequenzierung der N-terminalen Aminosäuresequenz erfolgte direkt von der ProBlott TM-Membran mittels Edmann-Abau in einem Applied Biosystems 494 Procise Sequenzer (FA. Applied Biosystems) mit den Standard-Gas-Phase Programmen der Hersteller (Maiorino 1996).

2.10 Spektroskopische und chromatographische Verfahren

2.10.1 Gaschromatographie und Massenspektroskopie (GC/MS)

Proben für die Massenspektrometrie wurden mit Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH) (Machery-Nagel, Düren, Germany) nach Angaben des Herstellers oder mit Diazomethan derivatisiert und mit einem GC-MS-System der Fa. Shimadzu (Kyoto, Japan) vermessen:

| | |
|----------------------|--------------------------------------|
| Gaschromatograph: | GC 17A |
| Massenspektrometer: | QP 5000 quadrupole MS |
| Autoinjector: | AOC-17 |
| Säule: | XTI-5 (Resteck, Bellefonte, PA, USA) |
| Bedienungs-Software: | Class LC 5000 |

Die eingesetzten Proben wurden im Gaschromatographen aufgetrennt und die getrennten Substanzen direkt mittels Elektronenstoß-Massenspektrometrie (70 eV) bei einer Temperatur der Ionenquelle von 320°C und mit Helium als Trägergas (1.0 ml/min) analysiert.

2.10.2 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Das Verfahren diente zur Auftrennung, Identifizierung und Quantifizierung von Substraten und Metaboliten. Es wurde die "reversed phase"-Adsorptionschromatographie verwendet, bei der das Laufmittel polarer ist als die stationäre Phase. Laufmittel war Methanol der höchsten Reinheitsstufe ("HPLC-Grade", Baker, Phillipsburg, USA) in wässriger Lösung. Die Eluenten wurden durch den Zusatz von 1⁰/₀₀ H₃PO₄ (v/v) bzw. 0,1⁰/₀₀ H₃PO₄ (v/v) angesäuert, um Carboxylgruppen zu protonieren und so in undissoziierter Form zur Erzielung einer ausreichenden Retention auf der Säule zu erhalten.

2.10.3 Analytische HPLC

Substanzen und Substanzgemische wurden qualitativ und quantitativ analysiert.

Verwendete HPLC-Anlage (Fa. Shimadzu, Kyoto, Japan):

LC-Workstation, System Class LC 10 Version 1.2 für Shimadzu High Performance Liquid Chromatograph LC 10A Series mit:

| | |
|--------------|--|
| Pumpe: | Shimadzu FCV-10-AC |
| Entgaser: | Shimadzu DGU-3A |
| Injektor: | Typ 7125 (Fa. Rheodyne, Cotati, CA, USA) |
| Autosampler: | Shimadzu SIL 10 A |
| Detektor: | Shimadzu SPD-M10A |
| Trennsäule: | Ø 4,6mm * 125mm, gefüllt mit Lichrospher 100 RP8 (Merck, Darmstadt), Ø 5µm |
| | oder Ø 4,6mm * 250mm, gefüllt mit Spherisorb ODS II (Merck, Darmstadt), Ø 5µm |

Es wurde isokratisch mit verschiedenen Methanolkonzentrationen zwischen 0 und 70% (v/v) bei einer Flußrate von 1 ml/min eluiert. Das Fließmittel wurde, durch die Pumpen gesteuert, aus dest. Wasser mit 1⁰/₀₀ H₃PO₄ und 90%igem Methanol mit 1⁰/₀₀ H₃PO₄ gemischt.

Maleylpyruvat und dessen Abbauprodukte wurden mit 0,1⁰/₀₀ H₃PO₄ (v/v) in dest. Wasser ohne Methanolzugabe unter Verwendung der ODS II-Säule analysiert.

Beide Eluenten wurden direkt vor der Benutzung unter Wasserstrahlpumpen-Vakuum filtriert ($\varnothing = 0,45\mu\text{m}$).

Es wurden je 10 μl der Probe entweder manuell, oder durch einen Autosampler injiziert. Ausgewertet wurde die vom Computer durch Integration ermittelte Signalfäche.

Soweit vorhanden wurden Spektren der Signale im Bereich von 200 nm - 400 nm aufgenommen und mit Spektren von vorhandenen Standards verglichen, um eine einwandfreie Identifizierung zu gewährleisten.

2.10.4 Präparative HPLC

Die präparative Auftrennung von Substanzgemischen erfolgte mit folgender Anlage:

| | |
|-------------|---|
| Pumpe | Einkanal-Pumpe ConstaMetric 3000 (LDC Analytical, Riviera Beach, FL, USA) |
| Injektor | Typ 7125 (Rheodyne, Cotati, USA) |
| UV-Detektor | SpektoMonitor 31003000 (LDC Analytical, Riviera Beach, FL, USA) |
| Integrator | HP 3396A (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) |
| Vorsäule | Säulentyp GG350 ($\varnothing = 16\text{mm} * 30\text{mm}$), gefüllt mit LiChrospher RP8 (Merck, Darmstadt) |
| Trennsäule | Säulentyp GG350($\varnothing = 16\text{mm} * 250\text{mm}$), gefüllt mit LiChrospher RP8 (Merck, Darmstadt) 10 μm (Säulentechnik Dr.Ing.H. Knauer GmbH, Bad Homburg) |

Die Trennung erfolgte isokratisch mittels mit 0,1⁰/₀₀ Trifluoressigsäure angesäuerten Methanol unterschiedlicher Konzentration als Eluent bei einer Flußrate von 6 ml/min. Der Trennungsverlauf wurde durch die UV-Extinktion in der Durchflußzelle bei einer Wellenlänge von $\lambda = 210\text{ nm}$ verfolgt.

Die Analyte wurden direkt nach Passieren der Durchflußzelle des UV-Detektors aufgefangen. Zusätzlich wurde die Reinheit der Analyte mittels analytischer HPLC überprüft.

2.11 Chemikalien

Wenn nicht anders beschrieben, wurden handelsübliche Chemikalien der Reinheit "zur Analyse" verwendet. Die Chemikalien stammten von den Firmen Merck (Darmstadt), Fluka (Neu-Ulm), Riedel deHaen (Seelze), Aldrich Chemie (Steinheim), J.T. Baker B.V. (Deventer, Niederlande), Sigma (Deisenhofen), Oxoid (Basingstoke, Hampshire, England), Difco (Detroit, IL, USA), Roth (Karlsruhe) und TCI (Tokyo, Japan). 36DC2MBA wurde von Promochem (Heidelberg) bezogen. 3,6-Dichlorsalicylsäure, 3,6-Dichlorgentisinsäure und 3,6-Dichlorbrenzkatechin wurden von Herrn Dr. H.-A. Arfmann (GBF, Abteilung Mikrobiologie, Braunschweig) synthetisiert und mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Maleylpyruvate und 3,6-Dichlormaleylpyruvat wurden durch Oxidation von Gentisat bzw. 3,6-Dichlorgentisat mit Zellextrakten von induzierten Zellen des Stammes *E. coli* BL21 (DE3) pJW48 hergestellt, der auf dem Plasmid das Gen für die klonierte und überexprimierte Gentisat-1,2-Dioxygenase trägt.

Enzyme für molekularbiologische Anwendungen und Antibiotika wurden von Boehringer (Mannheim), Pharmacia (Freiburg), New England Biolabs (Schwalbach/Taunus), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), Stratagene (Heidelberg) oder Invitrogen (Leek, Holland) bezogen. Oligonukleotidprimer für PCR- oder Sequenzreaktionen wurden bei Gibco-BRL (Eggenstein) bestellt.

2.12 Datenverarbeitung - Software

Die Textverarbeitung erfolgte mit Hilfe des Programmes Word[®] for Windows[™] Version 7.0 (Microsoft Corporation, USA). Die graphische Darstellung und Auswertung einiger Meßdaten erfolgte mit Hilfe des Programmes SigmaPlot[®] for Windows[™], Version 4.0 (Jandel Scientific, Erkrath). Chemische Formeln wurden mit dem Programm ChemWindow[®] for Windows[™], Version 3.0 (SoftShell International Ltd., Colorado, USA) erstellt.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Identifizierung des Stammes RW5

3.1.1 Anreicherung und Isolierung des Stammes RW5

Stamm RW5 wurde mit 36DC2MBA als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle aus aeroben Sedimenten des Flusses Elbe bei Hamburg, Stadtteil Blankenese, Teufelsbrück isoliert. Die Anreicherung wurde in Flüssigkultur unter normalen atmosphärischen Bedingungen durchgeführt. Aus dieser Anreicherung wurde eine Reinkultur, Stamm RW5, durch Verdünnungsserien und Ausplattieren auf Mineralsalzplatten mit der Zielverbindung isoliert. Stamm RW5 ist ein aerobes, gram-negatives, Oxidase-negatives, nicht bewegliches Stäbchen.

3.1.2 Identifizierung des Stammes RW5 mit dem Biolog-Test

Zur Identifizierung des Stammes RW5 sollte der Biolog-Test angewendet werden. Dieser Test zur Identifizierung von Bakterien basiert auf der Verwertung von 96 verschiedenen C-Quellen in einer Mikrotiterplatte. Die Ergebnisse werden in eine vom Hersteller mitgelieferte Datenbank gegeben und mit dem Muster der Verwertung von C-Quellen bereits bekannter Bakterienstämme verglichen.

Biolog-Mikrotiterplatten wurden mit Zellen des zu identifizierenden Stammes RW5 inokuliert und bei 30° C für 4 bzw. 24 Stunden inkubiert. Die Auswertung der Mikrotiterplatten für den Stamm RW5 zeigte weder nach 4 h noch nach 24 h eindeutige Ergebnisse, da die Ähnlichkeit zu Bakterienstämmen, die in der Datenbank vorhanden waren, unterhalb des vom Hersteller bezeichneten Grenzwertes für eine eindeutige Identifizierung lagen. Die höchsten ermittelten Ähnlichkeiten wurden nach 4 Stunden zu *Shewanella putrefaciens* A mit 47,9 % und nach 24 Stunden zu *Xanthomonas maltophilia* mit 22,8 % festgestellt. Aufgrund dieser geringen Ähnlichkeiten, wurden die Mikrotiterplatten abweichend von den Angaben des Herstellers für insgesamt 84 Stunden bei 30° C weiter inokuliert und die gewonnen Daten mit der Datenbank

für eine Inkubation nach 24 h verglichen. Nach der Inkubation von 84 Stunden konnte die Ähnlichkeit zu *Xanthomonas maltophilia* zwar auf 62,1 % erhöht werden, eine gesicherte Identifizierung des Stammes RW5 mittels Biolog-Test war jedoch nicht möglich.

3.1.3 Identifizierung des Stammes RW5 durch 16S rDNA-Analyse

Da die Identifizierung des Stammes RW5 mittels des Biolog-Tests kein gesichertes Ergebnis lieferte, sollte zur eindeutigen Identifizierung eine Analyse der 16S rDNA durchgeführt werden. Hierzu wurde nahezu das gesamte Gen, das für die 16S rDNA kodiert, bis auf 27 Nukleotide am 5'-Ende sowie 18 Nukleotide am 3'-Ende mittels PCR amplifiziert. Die aus der PCR resultierenden 1444 Nukleotide wurden beidsträngig sequenziert und Sequenzvergleiche mit 16S rDNA-Genen bekannter Organismen durchgeführt.

Die Analyse ergab, daß die Sequenz des 16S rDNA-Gens des Stammes RW5 die größte Ähnlichkeit zu Sequenzen von Organismen der α -Unterklasse der Proteobakterien besitzt. Die höchste Ähnlichkeit konnte zu Organismen der Gattung (Yabuuchi et al. 1990) festgestellt werden (Abbildung 3). Innerhalb dieser Gattung zeigten *S. rosa* und *S. macrogoltabidus* mit einer Homologie von 94,6 % bzw. 93,9 % die größte Ähnlichkeit. Die Sequenzähnlichkeit des 16S rDNA-Gens des Stammes RW5 zu weiteren Spezies der Gattung *Sphingomonas* lag zwischen 94,6 % (*S. rosa*) und 89,9 % (*S. sanguis*) (Tabelle 3). Diese Homologie-Werte entsprechen denen anderer Sphingomonaden beim Vergleich innerhalb ihrer Familie. Die Sequenz des Stammes RW5 unterscheidet sich dennoch so signifikant von den Sequenzen aller anderen bekannten Spezies der Gattung *Sphingomonas*, daß der Stamm RW5 als eigene Spezies identifiziert werden kann.

Tabelle 3: Sequenzähnlichkeit zwischen dem 16S rDNA-Gen des Stammes RW5 und 16S rDNA-Genen anderer Sphingomonaden und Spezies der α -Unterklasse der Proteobakterien.

| Spezies | Stamm ^α | Registrier- Nummer ^β | % Sequenzähnlichkeit zu <i>Sphingomonas</i> sp. RW5 |
|--------------------------------------|-------------------------|------------------------------------|--|
| <i>Sphingomonas rosa</i> | IFO 15208 ^T | D13945 | 94,6 |
| <i>Sphingomonas macrogoltabidus</i> | IFO 15033 ^T | D13723 | 93,9 |
| <i>Sphingomonas capsulata</i> | IFO 12533 ^T | D16147 | 93,1 |
| <i>Sphingomonas yanoikuyae</i> | JCM 7371 ^T | X72725 | 92,2 |
| <i>Sphingomonas terrae</i> | IFO 15098 ^T | D13727 | 91,9 |
| <i>Sphingomonas chlorophenolica</i> | ATCC 33790 ^T | X87161 | 91,5 |
| <i>Sphingomonas mali</i> | IFO 15500 ^T | Y09638 | 91,3 |
| <i>Sphingomonas pruni</i> | IFO 15498 ^T | Y09637 | 91,3 |
| <i>Sphingomonas asaccharolytica</i> | IFO 10564 ^T | Y09639 | 91,0 |
| <i>Sphingomonas adhaesiva</i> | JCM 7370 ^T | X72720 | 90,5 |
| <i>Sphingomonas paucimobilis</i> | DSM 1098 ^T | X72722 | 90,5 |
| <i>Sphingomonas trueperi</i> | ATCC 12417 ^T | X97776 | 90,5 |
| <i>Sphingomonas parapaucimobilis</i> | JCM 7510 ^T | X72721 | 90,4 |
| <i>Sphingomonas sanguis</i> | JCM 13937 ^T | D13726 | 89,9 |
| <i>Rhizomonas suberifaciens</i> | IFO 15211 ^T | D13737 | 92,7 |
| <i>Porphyrobacter neustonensis</i> | JCM 2844 ^T | L01785 | 91,8 |
| <i>Erythrobacter longus</i> | JCM6170 ^T | D12699 | 90,8 |
| <i>Brevundimonas diminuta</i> | ATCC 11568 ^T | M59064 | 87,2 |
| <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | DSM 30150 ^T | M11223 | 87,0 |

^αDSM, Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germany; JCM, Japanese collection of Microorganisms, Wako, Saitama, Japan; IFO, Institute of Fermentation, Yodogawa-ku, Osaka, Japan; ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, MD., USA. ^β Registriernummern der Sequenzen aus der EMBL Nukleotidsequenz-Datenbank

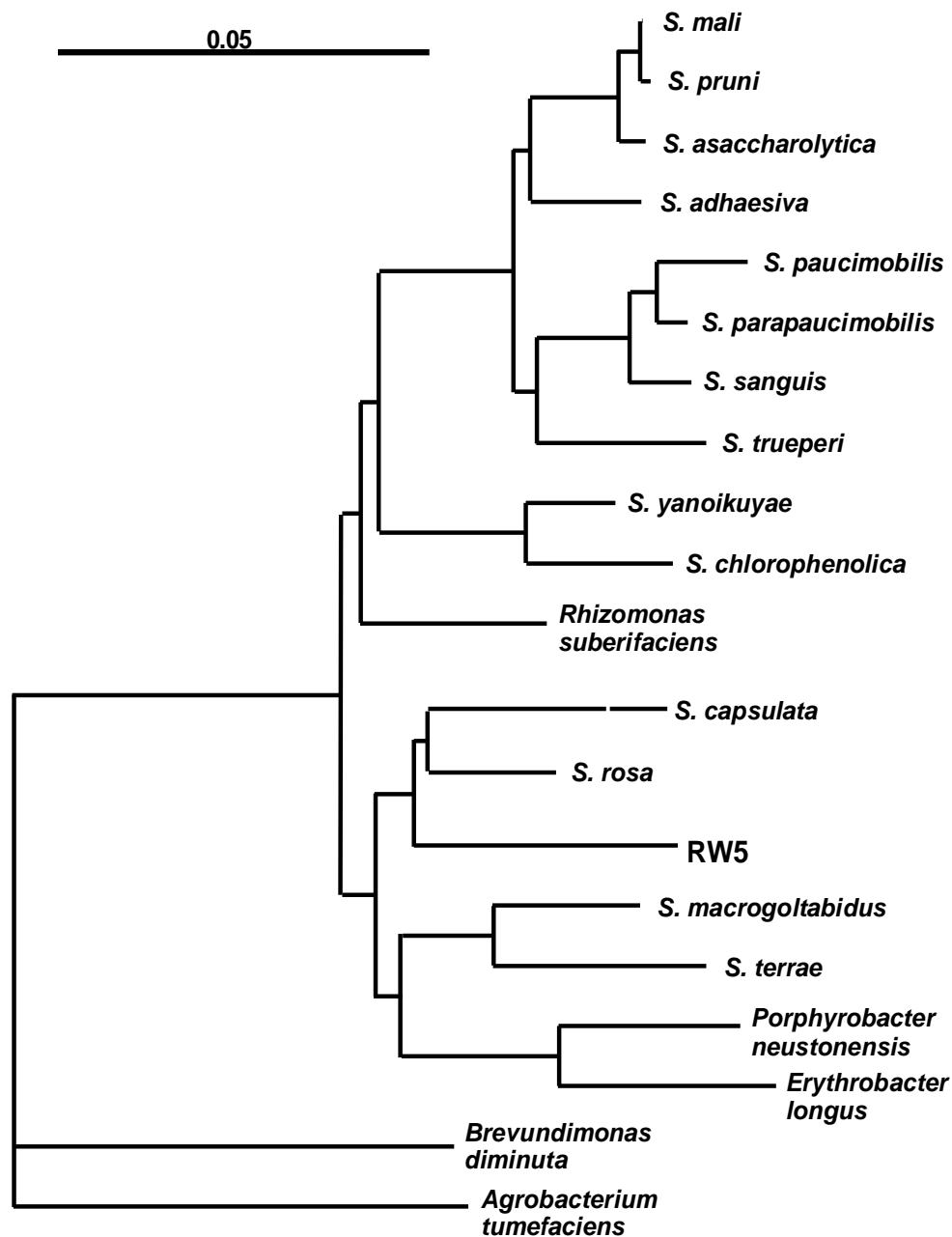


Abbildung 3: Phylogenetischer Stammbaum des 36DC2MBA abbauenden Isolates RW5 innerhalb der Gattung *Sphingomonas*. Die phylogenetische Eingruppierung basiert auf der Berechnung evolutiver Abstände aus paarweisen Vergleichen nahezu kompletter 16S rDNA-Gene unter Berücksichtigung des Jukes-Cantor-Korrekturfaktors. Verwendete Organismen und deren Registriernummern der Sequenzen aus der EMBL Nukleotidsequenz-Datenbank sind in Tabelle 3 aufgeführt. Eine Einheit des Balkens entspricht 5 Substitutionen pro 100 Nukleotidpositionen.

3.2 Untersuchungen zum Abbaupotential von Stamm RW5

Eines der Ziele dieser Arbeit war es, den von Stamm RW5 beschrittenen Abbauweg für 36DC2MBA aufzuklären. Hierzu wurden mehrere Untersuchungen durchgeführt, wie z.B. die Aufnahme des Substratspektrums von Stamm RW5, die detaillierte Analyse des Wachstums von Stamm RW5 mit 36DC2MBA und dessen erstem Abbauprodukt 3,6-Dichlorsalicylat, die Bestimmung von Sauerstoffaufnahmeleistungen potentieller Substrate aus möglichen Abbauwegen für 36DC2MBA oder der Nachweis spezifischer Aktivitäten von Enzymen, die möglicherweise am Abbau von 36DC2MBA beteiligt sind. Aus diesen Ergebnissen sollen Rückschlüsse darauf gezogen werden, gegenüber welchen Substanzen ein Abbaupotential vorliegt, so daß ein Abbauweg vorgeschlagen werden kann. Für den Abbau chlorierter Salicylate sind bisher zwei Abbauewege beschrieben worden: ein Abbaupfad verläuft über den sog. Chlorbrenzkatechin-Abbaupfad (Lehrbach 1984; Rubio et al. 1986), ein zweiter über den sog. Chlorgentisat-Abbaupfad (Crawford 1979; Hagedorn 1980; Schmitz et al. 1997). Für die nachfolgenden Untersuchungen ist daher das Abbaupotential gegenüber 3,6-Dichlorbrenzkatechin und 3,6-Dichlorgentisat bzw. deren unchlorierter Grundkörper für die Formulierung eines Abbaupfades von Interesse.

3.2.1 Substratverwertung des Stammes RW5

Für den Stamm RW5 sollte ein Substratverwertungsspektrum erstellt werden. Hierzu wurden die in Tabelle 4 dargestellten aromatische Verbindungen auf Verwertung als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle getestet.

Stamm RW5 ist in der Lage, 36DC2MBA, 3,6-Dichlorsalicylat sowie 3-Chlorsalicylat und unchloriertes Salicylat als C-Quelle zu verwerten. 3,6-Dichlorsalicylat, das wiederholt als erstes Abbauprodukt von 36DC2MBA beschrieben wurde (Smith 1973; Smith 1974; Smith 1975; Taraban et al. 1993; Weks et al. 1994; Yang et al. 1994; Wang 1995; Yang 1995), wird von Stamm RW5 aufgenommen und verwertet. Eine Chlorsubstitution in 3'-Position am aromatischen Ring wird ebenfalls toleriert, wogegen 4- oder 5-Chlorsalicylat nicht verwertet werden können. 6-Chlorsalicylat war kommerziell nicht erhältlich.

Tabelle 4: Verwertung von aromatischen Verbindungen als C-Quelle durch *Sphingomonas* sp. RW5

| C-Quelle | Verwertung | C-Quelle | Verwertung |
|--------------------------|------------|----------------------|------------|
| 36DC2MBA | + | 2,3-Dihydroxybenzoat | - |
| | | 2,4-Dihydroxybenzoat | - |
| 3,5,6-Trichlorsalicylat | - | 2,6-Dihydroxybenzoat | - |
| 3,6-Dichlorsalicylat | + | 3,4-Dihydroxybenzoat | + |
| 3,5-Dichlorsalicylat | - | 3,5-Dihydroxybenzoat | - |
| 3-Chlorsalicylat | + | 3-Hydroxybenzoat | - |
| 4-Chlorsalicylat | - | 4-Hydroxybenzoat | + |
| 5-Chlorsalicylat | - | Benzoat | + |
| Salicylat | + | | |
| | | 2-Chlorbenzoat | - |
| 3,6-Dichlorgentisat | + | 3-Chlorbenzoat | - |
| Gentisat | + | 4-Chlorbenzoat | - |
| | | 2,3-Dichlorbenzoat | - |
| 3,6-Dichlorbrenzkatechin | - | 2,4-Dichlorbenzoat | - |
| Brenzkatechin | + | 2,5-Dichlorbenzoat | - |
| | | 3,4-Dichlorbenzoat | - |
| Naphthalin | - | 3,5-Dichlorbenzoat | - |
| Dibenzofuran | - | | |

Die untersuchten Substanzen wurden in Flüssigkulturen mit einer Konzentration zwischen 1 und 3 mM unter atmosphärischen Bedingungen eingesetzt und bei 30 °C und 150 UpM in Erlenmeyerkolben mit Schikane inkubiert.

3,6-Dichlorgentisat und auch unchloriertes Gentisat werden von Stamm RW5 als C-Quelle verwertet. Stamm RW5 kann jedoch 3,6-Dichlorbrenzkatechin und auch 3-Chlorbrenzkatechin nicht als C-Quelle verwerten. Lediglich unchloriertes Brenzkatechin wird als C-Quelle genutzt, so daß Stamm RW5 möglicherweise einen Brenzkatechin-Abbauweg, aber keinen Chlorbrenzkatechin-Abbauweg besitzt. Es wurde außerdem überprüft, ob der Stamm RW5 die mehrkernigen Aromaten Naphthalin und Dibenzofuran, die über Salicylat als Intermediat

abgebaut werden (Starovoitov et al. 1975; Fortnagel et al. 1990; Grund et al. 1992), als C-Quelle nutzen kann. Obwohl die Verwertung von Salicylat möglich ist, konnten die beiden mehrkernigen Aromaten nicht verwertet werden. Mono- und dichlorierte Benzoate, die den chlorierten Salicylaten bis auf die Hydroxylgruppe in 2'-Position strukturähnlich sind, werden von Stamm RW5 ebenfalls nicht als C-Quelle verwertet. 3-Hydroxybenzoat, das über einen Gentisat-Abbaupfad aber auch über einen Protokatechuat-Abbaupfad abgebaut werden (Suemori et al. 1995), wird von Stamm RW5 nicht verwertet, obwohl Gentisat verstoffwechselt wird. 4-Hydroxybenzoat wird von z.B. *Pseudomonas putida* über den Protokatechuat-Abbaupfad mineralisiert (Nichols und Harwood 1995). Stamm RW5 ist hingegen in der Lage 4-Hydroxybenzoat und 3,4-Dihydroxybenzoat (Protokatechuat) zu verwerten, wobei 4-Hydroxybenzoat, nicht jedoch 3-Hydroxybenzoat zu Protokatechuat hydroxyliert wird.

3.2.2 Wachstum des Stammes RW5 mit 36DC2MBA und 3,6-Dichlorsalicylat

Das Wachstum von Stamm RW5 mit 36DC2MBA und 3,6-Dichlorsalicylat als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle wurde detaillierter analysiert. 3,6-Dichlorsalicylat wurde wiederholt als erstes Abbauprodukt des 36DC2MBA-Abbaus beschrieben (Smith 1973; Smith 1974; Smith 1975; Taraban et al. 1993; Weks et al. 1994; Yang et al. 1994; Wang 1995; Yang 1995). Es sollte daher untersucht werden, ob sich beim Wachstum mit 3,6-Dichlorsalicylat Unterschiede zum Wachstum mit 36DC2MBA feststellen lassen.

Der Stamm RW5 wuchs mit 36DC2MBA bis zu einer maximalen Konzentration von 45 mM in Flüssigkultur. Für die Wachstumsuntersuchungen wurden 5 mM 36DC2MBA eingesetzt. Eine Flüssigkultur des Stammes RW5 wuchs so bis zu einer maximalen Optischen Dichte (E_{600}) von 0,65 bei einer Verdopplungszeit von 7,7 h (Abbildung 4). Mittels HPLC konnte gezeigt werden, daß 36DC2MBA vollständig abgebaut wurde. Gleichzeitig wurden Chloridionen in stöchiometrischer Konzentration (10 mM) freigesetzt. Diese Daten beweisen, daß 36DC2MBA komplett mineralisiert wurde. Während des Wachstums wurde mittels HPLC die Bildung eines Metaboliten beobachtet, der nach 40 h eine maximale Konzentration von 0,06 mM erreichte und am Ende der Wachstumsphase nahezu vollständig verschwand. Dieser Metabolit konnte durch vergleichende Strukturaufklärung mit einem chemisch-synthetisierten

Standard als 3,6-Dichlorgentisat identifiziert werden (siehe 0). Die Konzentration von 3,6-Dichlorgentisat konnte im Anschluß an die Identifizierung mittels einer Kalbriergeraden des chemischen Standards mittels HPLC bestimmt werden.

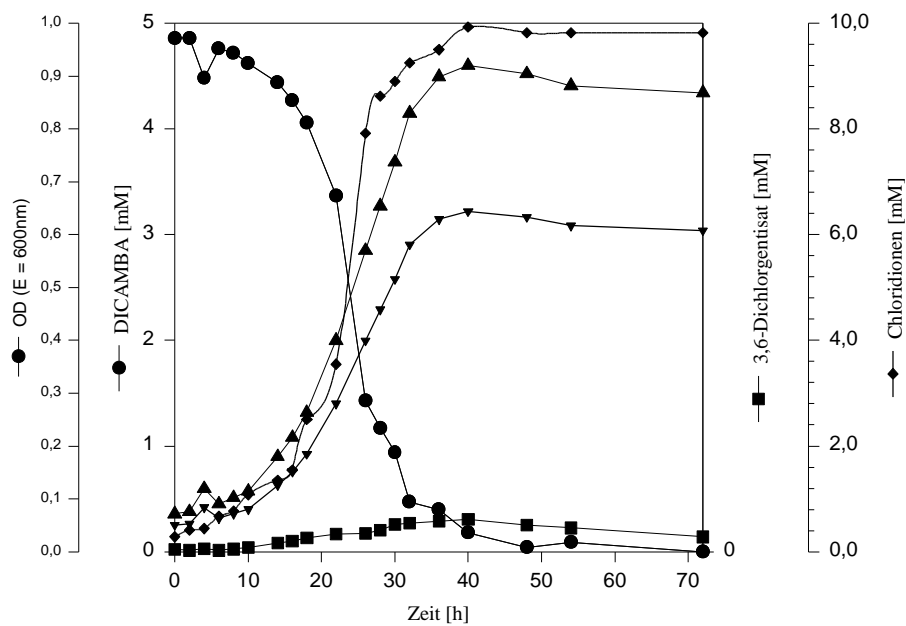


Abbildung 4: Wachstum von *Spingomonas* sp. RW5 mit 5 mM 36DC2MBA

Der Stamm RW5 tolerierte 3,6-Dichlorsalicylat nur in Konzentrationen bis zu 2 mM. Diese Aufnahme geringerer Konzentrationen an 3,6-Dichlorsalicylat im Vergleich mit 36DC2MBA läßt sich damit erklären, daß 3,6-Dichlorsalicylat polarer als 36DC2MBA ist und mit steigender Polarität von Substraten die Wahrscheinlichkeit für einen Transportmechanismus in die Zelle steigt. Ein fehlender Transportmechanismus für 3,6-Dichlorsalicylat könnte somit möglicherweise die Aufnahme in die Zelle erschweren. Es wurde daher das Wachstum mit 2 mM 3,6-Dichlorsalicylat als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle analysiert. Mittels HPLC konnte nachgewiesen werden, daß 3,6-Dichlorsalicylat vollständig abgebaut wurde und

Chloridionen wurden in stöchiometrischer Menge bzw. Konzentration (4 mM) freigesetzt (Abbildung 5). Gleichzeitig nahm die Biomasse entsprechend zu und erreichte eine Optische Dichte (E_{600}) von 0.17 bei einer Verdopplungszeit von 19,6 h., so daß davon ausgegangen werden kann, daß auch 3,6-Dichlorsalicylat vollständig mineralisiert wurde. Ebenso wie beim Wachstum mit 36DC2MBA wurde auch beim Wachstum mit 3,6-Dichlorsalicylat die Bildung eines Metaboliten mittels HPLC beobachtet. Dieser Metabolit erreichte eine maximale Konzentration von 0.034 mM nach 33 h und wurde nach 120 Stunden wieder nahezu vollständig abgebaut. Dieser Metabolit wurde mit demjenigen, der beim Wachstum mit 36DC2MBA entstand, verglichen. Durch eine vergleichende Strukturaufklärung mit einem chemisch-synthetisierten Standard von 3,6-Dichlorgentisat konnte der Metabolit identifiziert werden (siehe 0). Es entsteht also wie beim Wachstum mit 36DC2MBA 3,6-Dichlorgentisat als Metabolit.

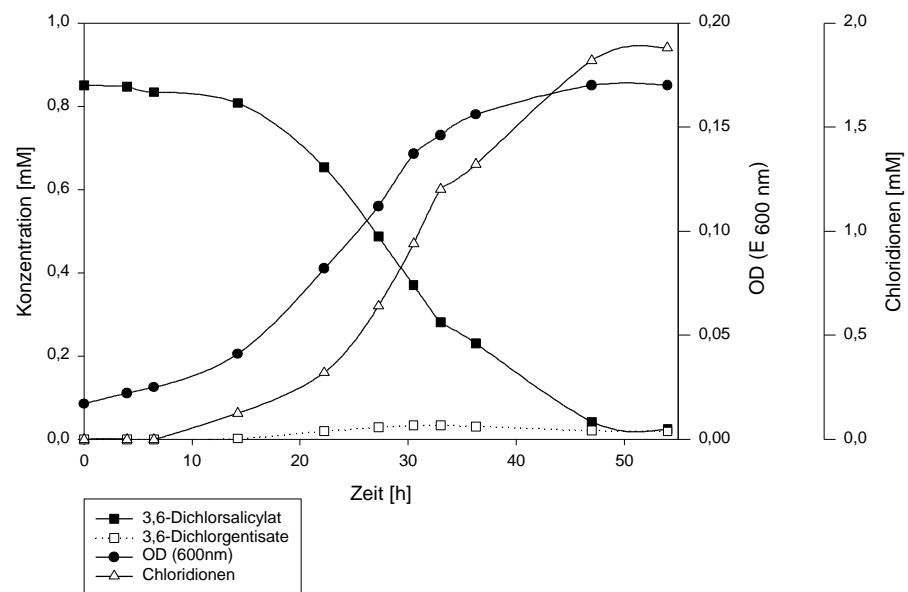


Abbildung 5: Wachstum von *Sphingomonas sp.* RW5 mit 2 mM 3,6-Dichlorsalicylat

3.2.3 Identifizierung von 3,6-Dichlorgentisat als Metabolit während des Wachstums mit 36DC2MBA bzw. 3,6-Dichlorsalicylat

Der beim Wachstum mit 36DC2MBA bzw. mit 3,6-Dichlorsalicylat entstandene Metabolit sollte identifiziert werden. Hierzu wurden Zellen des Stammes RW5 mit 36DC2MBA als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle angezogen. Nachdem der Metabolit seine maximale Konzentration erreicht hatte, wurde die Substanz durch Extraktion mit Ethylacetat aus dem angesäuerten Medium extrahiert und mittels präparativer HPLC zur Homogenität aufgereinigt (siehe 2.10.4). Die so isolierte Substanz zeigte in der analytischen HPLC die gleiche Retentionszeit und ein identisches UV-Spektrum wie ein chemisch-synthetisierter Standard von 3,6-Dichlorgentisinsäure. Zusätzlich sollte ein Massenspektrum die Identifizierung als 3,6-Dichlorgentisat bestätigen. Hierzu wurde die Substanz mit Trimethylsulfoniumhydroxid derivatisiert und das in Abbildung 6 gezeigte Massenspektrum mittels GC-MS-Analytik aufgenommen.

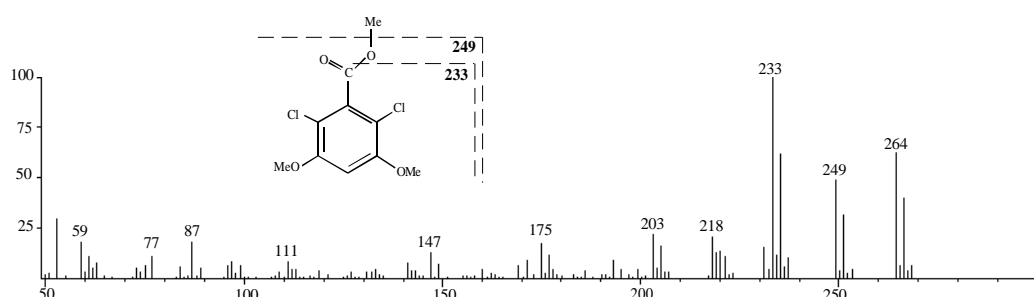


Abbildung 6: Massenspektrum (70eV) von Trimethylsulfoniumhydroxid-derivatisierter 3,6-Dichlorgentisinsäure

Das Fragmentierungsmuster entsprach vollständig dem für 3,6-Dichlorgentisinsäure theoretisch vorhergesagten Fragmentierungsmuster. Das Signal für das Molekül-Ion lag bei $m/z = 264$ und zeigte das typische Isotopenmuster einer dichlorierten Substanz. Die Abspaltung einer $-CH_3$ Gruppe führte zu einem Signal bei $m/z = 249$. Das Basissignal bei einem Molekulargewicht von 233 resultierte aus der Abspaltung einer $-OCH_3$ Gruppe. Weitere Fragmente wurden durch die Abspaltung der restlichen $-CH_3$ -Gruppen ($m/z = 218$ und $m/z =$

205) und der CO-Gruppe ($m/z = 175$) hervorgerufen. Der Metabolit, der beim Wachstum mit 36DC2MBA bzw. mit 3,6-Dichlorsalicylat entstand, konnte eindeutig als 3,6-Dichlorgentisat identifiziert werden.

Der Nachweis von 3,6-Dichlorgentisat als Intermediat beim 36DC2MBA-Abbau kann als Hinweis gewertet werden, daß 36DC2MBA möglicherweise über einen Chlorgentisat-Abbauweg mineralisiert wird. Die Bildung von 3,6-Dichlorgentisat als Metabolit während des 36DC2MBA-Abbaus wurde bereits im Rahmen anderer Untersuchungen zum 36DC2MBA-Abbau beobachtet. So wurde mittels GC-MS-Analytik beim natürlichen Abbau von 36DC2MBA im unsterilen, aeroben Boden 3,6-Dichlorgentisat als Metabolit nachgewiesen. (Krueger et al. 1991). 36DC2MBA-resistente Pflanzen entgiften 36DC2MBA durch eine Transformation zu 5-Hydroxy-36DC2MBA (Krueger et al. 1991). Diese Transformation stellt eine vergleichbare Hydroxylierung des aromatischen Ringes in 5-Position dar; ebenso die von der Salicylat-5-Hydroxylase katalysierte Reaktion von Salicylat zu Gentisat. Beim Wachstum des Stammes *Pseudomonas orvilla* mit 36DC2MBA als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle konnte ein Metabolit nachgewiesen werden, dessen Retentionszeit der von Gentisat entsprach (Subramanian et al. 1997). Die Autoren folgerten daraus, daß diese Substanz 3,6-Dichlorgentisinsäure sei. In der hier vorliegenden Arbeit konnte nun die Produktion von 3,6-Dichlorgentisat als Kulturmetabolit während des Wachstums einer Bakterienreinkultur mit 36DC2MBA zweifelsfrei nachgewiesen werden.

3.2.4 Bestimmung von Sauerstoffaufnahmezeiten von Ruhezellen des Stammes RW5

Die Aufnahme von Sauerstoffaufnahmezeiten von ruhenden Zellen des Stammes RW5 mit potentiellen Substraten aus möglichen Abbauwegen von 36DC2MBA geben einen Hinweis darauf, welche dieser Substanzen von dem zu untersuchenden Organismus oxidativ umgesetzt werden können. Hierzu wurden Zellen des Stammes RW5 mit 36DC2MBA oder Salicylat als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle angezogen und auf Oxidation verschiedener chlorierter Salicylate wie 3,6-Dichlorgentisat, 3,6-Dichlorbrenzkatechin, 3-Chlorbrenzkatechin und deren unchlorierte Grundkörper getestet.

Tabelle 5: Spezifische Sauerstoffaufnahmeraten von Ruhezellen des Stammes *Sphingomonas* sp. RW5

| Substrate | Spezifischer Sauerstoffverbrauch (nmol / min / mg Protein) | |
|--------------------------|---|-----------|
| | nach Anzucht mit | |
| | 36DC2MBA | Salicylat |
| 36DC2MBA | 17 | < 5 |
| 3,6-Dichlorsalicylat | 21 | 7 |
| 3-Chlorsalicylat | 50 | 20 |
| 4-Chlorsalicylat | 17 | 22 |
| 5-Chlorsalicylat | < 5 | 22 |
| Salicylat | 39 | 167 |
| 3,6-Dichlorgentisat | 25 | 12 |
| Gentisat | 43 | 105 |
| 3,6-Dichlorbrenzkatechin | 11 | 27 |
| 3-Chlorbrenzkatechin | 7 | 8 |
| Brenzkatechin | < 5 | 125 |

Zellen des Stammes RW5 wurden mit der jeweiligen C-Quellen (36DC2MBA oder Salicylat) bis zum Ende der exponentiellen Wachstumsphase angezogen, abzentrifugiert, 3-fach in 50mM Phosphatpuffer (pH 7,2) gewaschen und in dem selben Puffer auf eine optische Dichte (E_{600}) von 1,0 eingestellt. Die Sauerstoffaufnahmeraten wurden um die endogene Atmung korrigiert. Die dargestellten Daten wurden für jede C-Quelle aus mindestens 2 unabhängig durchgeführten Versuchen ermittelt, deren Werte gemittelt wurden.

Die Ergebnisse in Tabelle 5 daß, daß Ruhezellen des Stammes RW5, die auf 36DC2MBA angezogen wurden, signifikante spezifische Aktivitäten für 3-Chlorsalicylat, Gentisat und Salicylat sowie im Verhältnis zu diesen Aktivitäten dazu halb so hohe spezifische Aktivitäten für 3,6-Dichlorsalicylat, 4-Chlorsalicylat, 36DC2MBA und 3,6-Dichlorgentisat aufwiesen. Dagegen wurden 3-Chlorbrenzkatechin und 3,6-Dichlorbrenzkatechin nur geringfügig und 5-Chlorsalicylat und Brenzkatechin gar nicht oxidativ umgesetzt.

Diese Ergebnisse entsprechen den Daten, die für die 36DC2MBA-abbauenden Stämme *Pseudomonas orvilla* und *Pseudomonas maltophilia* DI-6 unlängst berichtet wurden (Subramanian et al. 1997). Beide Stämme zeigten nach Anzucht mit 36DC2MBA signifikante

Aktivitäten für Gentisat und Salicylat, im Verhältnis dazu etwa nur halb so hohe Aktivitäten für 36DC2MBA und 3,6-Dichlorsalicylat und keinerlei Aktivität für Brenzkatechin.

Die Hinweise aus der Substratverwertung von Stamm RW5 und der Bildung von 3,6-Dichlorgentisat als Metabolit während des 36DC2MBA-Abbaus legen die Vermutung nahe, daß 3,6-DC2MBA über einen Chlorgentisat-Abbauweg mineralisiert wird. Die Tatsache, daß ruhende Zellen des Stammes RW5 nach Anzucht mit 36DC2MBA keine bzw. nur geringfügige Sauerstoffaufnahmeraten für Brenzkatechin, 3,6-Dichlorbrenzkatechin und 3-Chlorbrenzkatechin, dagegen aber signifikante Sauerstoffaufnahmeraten für Gentisat bzw. 3,6-Dichlorgentisat aufwiesen, unterstützen diese Hypothese.

Ruhezellen des Stammes RW5, die mit Salicylat angezogen wurden, zeigten keine oder nur sehr geringe Aktivitäten für 36DC2MBA, 3,6-Dichlorsalicylat und 3,6-Dichlorgentisat. Hohe Aktivitäten wurden für Brenzkatechin, Gentisat und Salicylat sowie signifikante Aktivitäten für die monochlorierten Salicylate und interessanterweise für 3,6-Dichlorbrenzkatechin beobachtet. Da nach Anzucht mit Salicylat nur sehr geringe oder gar keine Aktivitäten für 36DC2MBA, 3,6-Dichlorsalicylat und 3,6-Dichlorgentisat gemessen werden konnten, wie sie hingegen nach Anzucht mit 36DC2MBA vorhanden waren, könnten entweder die Enzyme, die den Umsatz dieser drei Substanzen katalysieren, oder z.B. Substrataufnahmemechanismen der Zellen durch 36DC2MBA bzw. ein Metabolit des Abbaus von 36DC2MBA induzierbar sein. Beispielsweise wird der Brenzkatechin-Abbau in *Pseudomonas putida* über den *ortho*-Spaltungsweg (Abbildung 1) durch den positiven Transkriptionsfaktor CatR reguliert, der von *cis,cis*-Mucanat, einem Abbauprodukt von Brenzkatechin, induziert wird (Rothmel et al. 1990). Auffallend ist außerdem, daß die Zellen nach Anzucht mit Salicylat, im Gegensatz zu Zellen nach Anzucht mit 36DC2MBA, jetzt eine hohe Aktivität für Brenzkatechin zeigten. Möglicherweise induziert ein Wachstum mit Salicylat einen zusätzlichen Abbauweg über einen Brenzkatechinweg. Ein solcher Abbau von Salicylat über Brenzkatechin wurde bereits intensiv durch Analyse z.B. des Sal-Operons im Naphthalin-Abbau (Yen 1982) charakterisiert. Interessanterweise wurden Sauerstoffaufnahmeraten für 3,6-Dichlorbrenzkatechin mit ungefähr 20% und für 3-Chlorbrenzkatechin mit ungefähr 5% der Aktivität für unchloriertes Brenzkatechin gemessen. Von Brenzkatechin-1,2-Dioxygenasen des Typs I war bisher bekannt, daß sie 4-Chlorbrenzkatechin mit ungefähr 10% der Aktivität, 3-Chlorbrenzkatechin mit ca. 1% der Aktivität und dichlorierte Brenzkatechine mit weniger als 1% der Aktivität für den Umsatz unchlorierter Brenzkatechine besitzen (Dorn und Knackmuss 1978a; Dorn und

Knackmuss 1978b). Andererseits wurden bei *Rhodococcus erythropolis* 1CP Aktivitäten für 4-Chlorbrenzkatechin gefunden, die nur 5% geringer waren, als die Aktivitäten für unchloriertes Brenzkatechin. 3,5-Dichlorbrenzkatechin wurde in diesem Stamm auch noch mit 18% der Aktivität für unchloriertes Brenzkatechin umgesetzt (Maltseva et al. 1994). Für den Höhe des Umsatzes chlorierter Brenzkatechine gemessen am Umsatz unchlorierter Brenzkatechine scheint es also eine große Variabilität zu geben (Maltseva et al. 1994).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß Zellen des Stammes RW5 nach Anzucht mit 36DC2MBA Aktivitäten gegenüber möglichen Metaboliten eines Chlorgentisat-Abbauweges zeigen, aber keine Aktivität gegenüber Brenzkatechin bzw. 3,6-Dichlorbrenzkatechin. Die Aktivitäten für 36DC2MBA, 3,6-Dichlorsalicylat und 3,6-Dichlorgentisat sind nach Anzucht von 36DC2MBA induziert.

3.3 Enzymaktivitäten in zellfreien Extrakten des Stammes RW5

Die Ergebnisse der Sauerstoffaufnahmeraten von Ruhezellen des Stammes RW5 nach Anzucht mit 36DC2MBA hatten gezeigt, daß Ruhezellen des Stammes RW55 gegenüber Substraten aus einem möglichen Chlorgentisat-Abbauweg eine deutliche Aktivität aufwiesen, dagegen aber gegenüber Substraten aus einem möglichen Chlorbrenzkatechin-Abbauweg sehr geringe oder keine Aktivität zeigten. Mit Hilfe von Enzymtests sollten spezifische Enzymaktivitäten der am Abbau beteiligten Enzyme ermittelt werden, um die bisherigen Ergebnisse zu überprüfen. Hierzu wurden Zellen des Stammes RW5 mit 36DC2MBA bzw. Salicylat als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle angezogen und zellfreie Extrakte wie unter 2.8.1 beschrieben hergestellt. Von den in Tabelle 6 dargestellten Enzymen konnte nur die Aktivität einer Gentisinsäure-1,2-Dioxygenase in zellfreien Extrakten nachgewiesen werden. Nach Anzucht mit 36DC2MBA oder Salicylat wurden spezifische Aktivitäten weder für eine Brenzkatechin-1,2-Dioxygenase oder Brenzkatechin-2,3-Dioxygenase noch für eine Salicylat-1-Hydroxylase oder Salicylat-5-Hydroxylase gefunden.

Tabelle 6: Spezifische Enzymaktivitäten von Enzymen in zellfreien Extrakten von Stamm RW5.

| Enzyme | Substrate | Spezifische Aktivität (U/mg) nach Anzucht mit | |
|--------------------------------|--------------------------|--|-----------|
| | | 36DC2MBA | Salicylat |
| Salicylat-1-Hydroxylase | Salicylat | < 1 | < 1 |
| | 3,6-Dichlorsalicylat | < 1 | < 1 |
| Salicylat-5-Hydroxylase | Salicylat | < 1 | < 1 |
| | 3,6-Dichlorsalicylat | < 1 | < 1 |
| Brenzkatechin-1,2-Dioxygenase | Brenzkatechin | < 1 | < 1 |
| | 3-Chlorbrenzkatechin | < 1 | < 1 |
| | 4-Chlorbrenzkatechin | < 1 | < 1 |
| | 3,6-Dichlorbrenzkatechin | < 1 | < 1 |
| Brenzkatechin -2,3-Dioxygenase | Brenzkatechin | < 1 | < 1 |
| | 3-Chlorbrenzkatechin | < 1 | < 1 |
| | 4-Chlorbrenzkatechin | < 1 | < 1 |
| | 3,6-Dichlorbrenzkatechin | < 1 | < 1 |
| Gentisat 1,2-Dioxygenase | Gentisat | 0,426 | 0,526 |
| | 3,6-Dichlorgentisat | 0,023 | 0,013 |

Spezifische Aktivitäten der Enzyme wurden in zellfreien Extrakten des Stammes RW5 nach Anzucht mit der jeweiligen C-Quelle (36DC2MBA oder Salicylat) gemessen. Die dargestellten Daten wurden aus mindestens 2 unabhängig durchgeführten Versuchen ermittelt, deren Werte als Mittelwert dargestellt sind.

Nach Anzucht mit 36DC2MBA konnten trotz der signifikanten spezifischen Sauerstoffaufnahme für 3,6-Dichlorsalicylat und Salicylat keine spezifischen Enzymaktivitäten für eine Salicylat-1-Hydroxylase oder eine Salicylat-5-Hydroxylase festgestellt werden. Da anhand der bisherigen Ergebnisse vermutet wird, daß ein Abbau über einen Chlorogentisat-Abbauweg erfolgt, ist die nicht nachweisbare Aktivität für eine Salicylat-1-Hydroxylase sicherlich zu erwarten. Es konnte allerdings auch keine Aktivität für eine Salicylat-5-Hydroxylase nachgewiesen werden. Fuenmayor et al. (1998) waren erstmals in der Lage, die Gene einer Salicylat-5-Hydroxylase aus *Pseudomonas* sp. U2 zu klonieren. Dieser

Multi-Enzym-Komplex besteht aus einer großen und kleinen Dioxygenase-Untereinheit sowie einer Ferredoxin-Reduktase. Der Nachweis einer Aktivität für diese Salicylat-5-Hydroxylase wurde von den Autoren nur mittels Transformation von Salicylat durch induzierte *E. coli*-Zellen mit der rekombinanten Salicylat-5-Hydroxylase durchgeführt. Ein aktive Salicylat-5-Hydroxylase in zellfreien Extrakten des Wildtyps *Pseudomonas* sp. Stamm U2 und in zellfreien Extrakten von *E. coli* BL21 mit der rekombinanten Salicylat-5-Hydroxylase konnte von den Autoren nicht gezeigt werden. Aktivitäten von Salicylat-5-Hydroxylasen in zellfreien Extrakten konnten auch bei diversen anderen Stämmen nicht nachgewiesen werden, obwohl diese Bakterienstämme nachweislich einen Abbauweg von Salicylat über einen Gentisatweg besaßen (Wittich, pers. Mitteilung). Das Fehlen einer Aktivität für eine Salicylat-5-Hydroxylase in zellfreien Extrakten des Stammes RW5, sowie auch bei anderen Stämmen ist möglicherweise auf einen membrangebundenen Enzymkomplex zurückzuführen, der während der Herstellung eines zellfreien Extraktes inaktiviert wurde. Eine spezifische Aktivität für eine intradiolisch oder extradiolisch spaltende Brenzkatechin-Dioxygenase wurde weder für unchlorierte noch für chlorierte Substrate nachgewiesen. Dieses bestätigt die sehr geringen bzw. nicht vorhandenen spezifischen Sauerstoffaufnahmeraten für Brenzkatechin und dessen chlorierte Derivate nach Anzucht mit 36DC2MBA. Zellfreie Extrakte des Stammes RW5 zeigten eine signifikante Aktivität für eine Gentisat-1,2-Dioxygenase (GDO). Dabei ist die spezifische Aktivität der GDO in zellfreien Extrakten des Stammes RW5 für Gentisat ca. 18-fach höher als für 3,6-Dichlorgentisat. Dieses Ergebnis bestätigt die Sauerstoffaufnahmeraten des Stammes RW5 für Gentisat und 3,6-Dichlorgentisat nach Anzucht mit 36DC2MBA.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die Analyse der spezifischen Enzymaktivitäten in zellfreien Extrakten des Stammes RW5 nach Anzucht mit 36DC2MBA keine Aktivität für Enzyme des Chlorobrenzkatechin-Abbaupweges ergeben. Trotz des Fehlens einer Aktivität für eine Salicylat-5-Hydroxylase konnte jedoch eine signifikante Aktivität für eine GDO nachgewiesen werden.

Nach Anzucht mit Salicylat konnten für zellfreie Extrakte des Stammes RW5 keine Aktivitäten für eine Salicylat-1-Hydroxylase oder eine Salicylat-5-Hydroxylase nachgewiesen werden. Salicylat-gewachsene Ruhezellen des Stammes RW5 zeigten jedoch hohe Sauerstoffaufnahmeraten für Salicylat. Da außerdem hohe Sauerstoffaufnahmeraten für Brenzkatechin gemessen wurden, war vermutet worden, daß eine Anzucht mit Salicylat einen zusätzlichen Brenzkatechin-Abbaupweg induziert. Dieses setzt voraus, daß Salicylat durch eine

Salicylat-1-Hydroxylase zu Brenzkatechin umgesetzt wird. Eine solche Enzymaktivität konnte aber in zellfreien Extrakten nicht nachgewiesen werden. Möglicherweise ist die Salicylat-1-Hydroxylase in Stamm RW5 membrangebunden, so daß das Enzym bei der Herstellung des zellfreien Extraktes inaktiviert wird. Für den Stamm *Pseudomonas putida* RW10 konnte ebenfalls keine Aktivität einer Salicylat-1-Hydroxylase in zellfreien Extrakten nachgewiesen werden (Brückmann 1996). Transposonmutanten des Stammes RW10 wuchsen zwar mit Salicylat als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle, eine aktive Salicylat-1-Hydroxylase konnte aber in zellfreien Extrakten nicht nachgewiesen werden, obwohl die Enzyme des Brenzkatechin-Abbaufweges aktiv waren. Für den Stamm RW5 war jedoch auch keine Aktivitäten für eine Brenzkatechin-Dioxygenase nachweisbar. Da zur Durchführung der Enzymtests Zellen des Stammes RW5 in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet wurden und anschließend bei 4 °C ein zellfreier Extrakt hergestellt und gelagert wurde, war erwartet worden, daß sich Aktivitäten für eine Brenzkatechin-Dioxygenase aufgrund der hohen Sauerstoffaufnahme für Brenzkatechin nachweisen lassen. Es ist nicht auszuschließen, daß sich die fehlende Aktivität einer Brenzkatechin-Dioxygenase auf eine Instabilität des Enzyms im zellfreien Extrakt zurückführen läßt. Wie unter 3.8.2 beschrieben, ist auch die rekombinante Gentisinsäure-1,2-Dioxygenase aus Stamm RW5 sehr instabil und verliert 90% ihrer Aktivität innerhalb von 48 h. Aktivitäten für eine der beiden Salicylat-Hydroxylasen wurden ebenfalls in zellfreien Extrakten des Stammes RW5 nicht gefunden. Möglicherweise ist die Instabilität dieser Enzyme ein generelles Problem bei Stamm RW5. Eine weitere mögliche Ursache für eine fehlende Aktivität einer Brenzkatechin-Dioxygenase könnte darauf zurückzuführen sein, daß die *cis,cis*-Muconat-Cycloisomerase des Stammes RW5 nicht durch EDTA gehemmt wird. Brenzkatechin wird durch die Brenzkatechin-1,2-Dioxygenase zu *cis,cis*-Muconat gespalten, das dann von der *cis,cis*-Muconat-Cycloisomerase weiter umgesetzt wird. Da der Nachweis der Brenzkatechin-1,2-Dioxygenase aber auf der photometrischen Zunahme des Ringspaltungsproduktes *cis,cis*-Muconat beruht, wird die *cis,cis*-Muconat-Cycloisomerase durch die Zugabe von EDTA inaktiviert. Wenn diese Inaktivierung durch EDTA bei der *cis,cis*-Muconat-Cycloisomerase des Stammes RW5 nicht erfolgreich wäre, würde in diesem Fall kein *cis,cis*-Muconat entstehen. Zur Klärung dieses Problems müßte ein Umsatzversuch mit zellfreien Extrakten des Stammes RW5 und Brenzkatechin durchgeführt werden, um den Umsatz von Brenzkatechin nachzuweisen.

3.3.1 Transformation von Maleylpyruvat mit zellfreien Extrakten des Stammes RW5

Gentisat wird durch die Gentisinsäure-1,2-Dioxygenase zu Maleylpyruvat gespalten. Maleylpyruvat kann entweder in einer Glutathion-abhängigen Reaktion zu Fumarylpyruvat umgesetzt werden, das nachfolgend durch eine Fumarylpyruvathydrolase in Fumarat und Pyruvat gespalten wird (Lack 1959; Lack 1961; Crawford et al. 1975; Hagedorn und Chapman 1985). Ein weiterer Abbauweg verläuft über eine direkte Hydrolyse von Maleylpyruvat zu Maleat und Pyruvat durch die Glutathion-unabhängige Maleylpyruvat-Hydrolase (Hopper et al. 1968). Es sollte nun für den Stamm RW5 überprüft werden, welcher der beiden möglichen Gentisat-Abbauwege in Stamm RW5 vorhanden ist. Hierzu wurde der Abbau von Maleylpyruvat in zellfreien Extrakten (vergleiche 2.8.3.7) aus mit 36DC2MBA-gewachsenen Zellen des Stammes RW5 untersucht. Maleylpyruvat wurde von zellfreien Extrakten des Stammes RW5 nicht weiter umgesetzt. Erst nach Zugabe von 66 μ M reduziertem Glutathion zum Reaktionsansatz wurde Maleylpyruvat vollständig abgebaut. Während des Umsatzes von Maleylpyruvat konnte die Produktion von Pyruvat mittels HPLC beobachtet werden. Fumarat konnte als weiteres Produkt dieser Reaktion nicht nachgewiesen werden.

Zusätzlich zur Transformation von Maleylpyruvat sollte auch die Transformation von 3,6-Dichlormaleylpyruvat durch zellfreie Extrakte des Stammes RW5 analysiert werden. 3,6-Dichlormaleylpyruvat konnte jedoch weder käuflich erworben werden, noch durch eine Transformation durch eine klonierte, überexprimierte GDO in ausreichender Menge biologische hergestellt werden. Der Umsatz von 3,6-Dichlormaleylpyruvat konnte daher nicht analysiert werden.

Da die Transformation von Maleylpyruvat durch zellfreie Extrakte des Stammes RW5 nur in Gegenwart von Glutathion erfolgt, muß angenommen werden, daß Maleylpyruvat erst durch die beschriebene Glutathion-abhängige Isomerisierung in Fumarylpyruvat umgesetzt wird, das nachfolgend zu Fumarat und Pyruvat gespalten wird. Mittels HPLC konnte Pyruvat als Produkt des Umsatzes von Maleylpyruvat mit zellfreien Extrakten des Stammes RW5 nachgewiesen werden; das erwartete Fumarat wurde nicht gefunden. Fumarat kann direkt durch Enzyme des Krebs-Zyklus weiter umgesetzt werden. Da der Reaktionsansatz sowohl zellfreien Extrakt von *E.coli* BL21 (DE3, pJW48) als auch von Zellen des Stammes RW5 enthielt, ist es möglich, daß Fumarat direkt in den Krebs-Zyklus eingeschleust wurde und daher nicht im Reaktionsgemisch nachgewiesen werden konnte.

3.4 Zusammenfassung des physiologischen Teils

Stamm RW5 mineralisiert 36DC2MBA und 3,6-Dichlorsalicylat vollständig unter Freisetzung stöchiometrischer Mengen von Chloridionen. Während des Wachstums mit beiden Verbindungen wurde jeweils ein Metabolit gebildet, der als 3,6-Dichlorgentisat identifiziert werden konnte. Stamm RW5 konnte u.a. mit 36DC2MBA, 3,6-Dichlorsalicylat und 3,6-Dichlorgentisat, aber nicht mit 3,6-Dichlorbrenzkatechin als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen. Nach Anzucht mit 36DC2MBA waren signifikante spezifische Sauerstoffaufnahmeleistungen für 36DC2MBA, 3,6-Dichlorsalicylat und 3,6-Dichlorgentisat nachzuweisen, aber nur sehr geringe für 3,6-Dichlorbrenzkatechin und keine für Brenzkatechin. In zellfreien Extrakten des Stammes war eine hohe spezifische Aktivität für eine GDO nachzuweisen, die auch 3,6-Dichlorgentisat umsetzen konnte. Aktivitäten für eine Brenzkatechin-Dioxygenase und eine Salicylat-5-Hydroxylase konnten nicht gezeigt werden. Die fehlende Aktivität für eine Salicylat-5-Hydroxylase ist möglicherweise mit einer Inaktivierung des Enzyms, abhängig von den Bedingungen zur Herstellung des zellfreien Extraktes, zu erklären. Maleylpyruvat wurde in einer Glutathion-abhängigen Reaktion vollständig abgebaut. Anhand dieser Ergebnisse kann darauf geschlossen werden, daß der Stamm RW5 36DC2MBA über einen Chlorgentisat-Abbauweg abbaut, wie er in Abbildung 7 dargestellt ist. Durch die Aufnahme spezifischer Sauerstoffaufnahmeleistungen für die Stämme *Pseudomonas oryzae* und *Pseudomonas maltophilia* DI-6 wurde unlängst von Subramanian et al. (1997) vermutet, daß ein Abbau von 36DC2MBA über einen Chlorgentisat-Abbauweg verlaufen könnte (Subramanian et al. 1997). Für den Abbau chlorierte Salicylate konnte ebenfalls wiederholt ein Abbau über einen Chlorgentisat-Abbauweg nachgewiesen werden. 4-Chlorsalicylat wird von dem Stamm *Variovorax* sp. Stamm 33 über 4-Chlorgentisat und Chlormaleylpyruvat als Intermediate abgebaut (Schmitz et al. 1997). Auch 3-Chlorsalicylat soll von einer Spezies der Gattung *Nocardia* über einen Chlorgentisat-Abbauweg abgebaut werden (Hagedorn 1980). Für 5-Chlorsalicylat wurde von Crawford et al. (1980) ein Abbau über einen „modifizierten 5-Chlorgentisat-Weg“ durch *Bacillus brevis* vorgeschlagen. Chlorierte Salicylate können grundsätzlich auch über einen Chlorbrenzkatechin-Abbauweg abgebaut werden. Dieses konnte durch die Konstruktion zweier Hybrid-Stämme gezeigt werden, die 3-, 4- und 5-Chlorsalicylat über einen Chlorbrenzkatechin-Abbauweg abbauten (Lehrbach 1984; Rubio et al. 1986). Schindowski et al. (1991) konnten für das natürliche Isolat *Burkholderia* sp. JWS (früher *Pseudomonas*) einen Abbau von 3- und 5-Chlorsalicylat,

sowie von 3,5-Dichlorsalicylat über einen Chlorbrenzkatechin-Abbauweg nachweisen. Die hier vorgestellten Experimente belegen für den Stamm RW5, daß 36DC2MBA über 3,6-Dichlorsalicylat und einen Chlorgentisat-Abbauweg mineralisiert wird

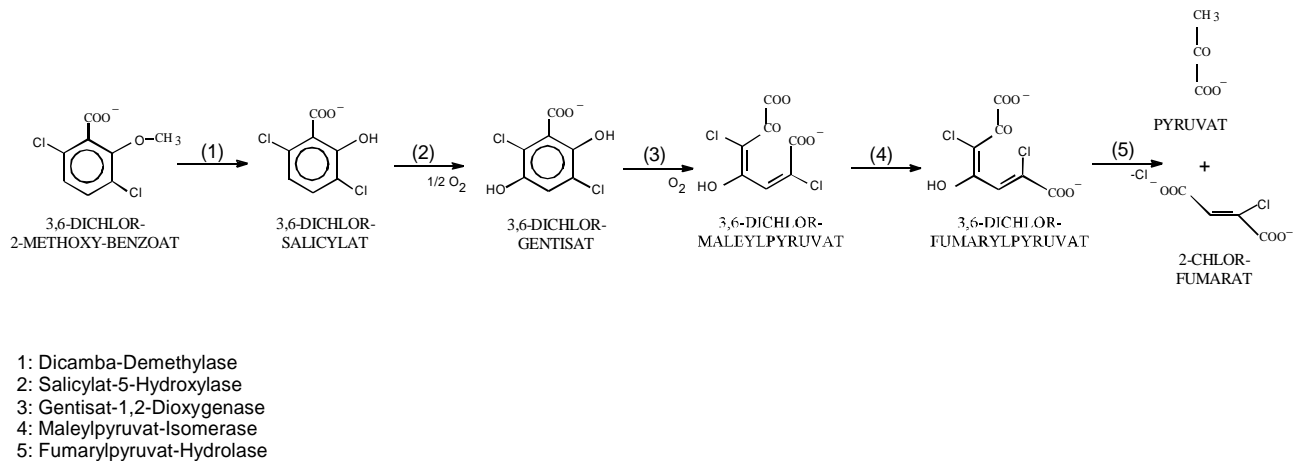


Abbildung 7: Vorgeschlagener Abbauweg von 36DC2MBA in *Spingomonas* sp. RW5..

3.5 Molekularbiologische Untersuchungen des 36DC2MBA-Abbaus

Die physiologischen Untersuchungen zum Abbau von 36DC2MBA ergaben, daß dieser über einen Chlorgentisat-Abbaupfad verläuft. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, Gene, die für am 36DC2MBA-Abbau beteiligte Enzyme kodieren, zu identifizieren und zu klonieren. Da in zellfreien Extrakten des Stammes RW5 nur eine Aktivität für eine Gentisat-1,2-Dioxygenase (GDO) nachgewiesen werden konnte, sollte versucht werden, das GDO-Gen zu identifizieren. Bisher war noch keines der Gene, die für Enzyme eines Gentisat- oder Chlorgentisat-Abbaupfades kodieren, charakterisiert worden. Daher sollte die GDO zunächst aus zellfreien Extrakten des Stammes RW5 mittels FPLC aufgereinigt werden, um partielle Aminosäuresequenzen der GDO zu bestimmen. Anhand der Aminosäuresequenzen sollten degenerierte Primer erstellt werden, um eine GDO-spezifische Gensonde mittels PCR zu amplifizieren, die zur Identifizierung des GDO-Gens des Stammes RW5 eingesetzt werden sollte. Die rekombinante GDO sollte im Anschluß daran biochemisch charakterisiert werden.

In der Vergangenheit wurden zahlreiche Untersuchungen an Genen, die für Enzyme aus Abbaupfaden anderer aromatischer Substanzen kodieren, durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, daß viele der Gene eines Abbaupfades in einem Gen-Cluster vorliegen, wie es z.B. für das Salicylat-Operon (Yen 1982) oder das Biphenyl-Operon (Hofer et al. 1994) beschrieben wurde. Es sollte daher für den Stamm RW5 außerdem die Genomstruktur ober- und unterhalb des GDO-Gens detaillierter analysiert werden, um möglicherweise weitere Gene des Gentisat-Abbaupfades zu identifizieren.

3.6 Aufreinigung der Gentisinsäure-1,2-Dioxygenase (GDO) aus zellfreien Extrakten des Stammes RW5

Die GDO des Stammes RW5 wurde mittels FPLC partiell (>95%) aufgereinigt. Hierzu wurde ein zellfreier Extrakt aus Stamm RW5, der mit 36DC2MBA als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle gewachsen waren, hergestellt. Die Aufreinigung bestand aus 2 chromatographischen Trennverfahren: einer Anionenaustausch Chromatographie (Anionenaustausch Chromatographie II) und einer Gelfiltration. Das aufgereinigte Enzym

hatte eine Größe von ungefähr 40 kDa in der SDS-PAGE und wurde durch ein halbtrockenes Protein-Blot Verfahren auf eine ProBlot-Membran transferiert (siehe 2.9.2.1).

3.6.1 Aminosäure-Sequenzierung der gereinigten Gentisinsäure-1,2-Dioxygenase

Von der auf die ProBlot-Membran transferierten GDO wurde direkt die aminoterminal Sequenz bestimmt. Dabei konnten mittels automatisiertem Edman-Abbau 43 Aminosäuren der GDO identifiziert werden:

Met-Gln-Pro-Val-Leu-Ala-Asn-Asp-Gln-Gln-Ala-Gln-Leu-Thr-Ala-Leu-Tyr-Asp-Glu-Met-Arg-Pro-Ala-Gly-Leu-Lys-Pro-Leu-Trp-Glu-Val-Leu-His-Ala-Leu-Val-Leu-Ala-Glu-Gln-Pro-Val-Leu-Ala-Asn-Asp-Gln-Gln-Ala-Gln-Leu-Thr-Ala-Leu-Tyr-Asp-Glu-Met-Arg-Pro-Ala-Gly-Leu-Lys-Pro-Leu-Trp-Glu-Val-Leu-His-Ala-Leu-Val-Leu-Ala-Glu-Pro-Ala-Glu-Leu.

Die aminoterminal Sequenz der GDO aus *Sphingomonas* sp. RW5 zeigte keine signifikante Homologie (< 10%) zu den bekannten aminoterminalen Sequenzen der GDOs aus *Comamonas testosteroni* und *Comamonas acidovorans* (Harpel 1990). Von Harayama und Timmis (1992) wurde u.a. vorgeschlagen, daß nur Ähnlichkeiten der Aminosäuresequenz zweier Proteine über 30% ausreichen, um von einer Homologie zwischen den Proteinen zu sprechen (Harayama und Timmis 1992). Da die Ähnlichkeit in diesem Fall deutlich unter 30 % lag, kann hier von keiner Homologie zwischen den aminoterminalen Sequenzen der GDOs aus den *Comamonas*-Stämmen und Stamm RW5 gesprochen werden. Durch einen LysC-Verdau wurden außerdem kleinere Peptid-Fragmente der GDO hergestellt, deren Aminosäuresequenzen ebenfalls mittels automatisiertem Edman-Abbau identifiziert wurden. Mit Hilfe dieser Aminosäuresequenzdaten sollten degenerierte Primer konstruiert werden, um so eine GDO-spezifische Gensonde herstellen zu können.

3.7 Klonierung und Sequenzierung des die Gentisinsäure-1,2-Dioxygenase kodierenden gtdA-Gens und dessen Umgebung

3.7.1 Herstellung einer für die Gentisinsäure-1,2-Dioxygenase spezifischen Gensonde

Das die GDO kodierende Gen (*gtdA*) sollte aus der DNA des Stammes RW5 kloniert werden. Hierzu wurden anhand der Aminosäure-Sequenzdaten des aminoterminalen Endes der GDO und eines Lys-C-verdauten Peptidfragments degenerierte Primer konstruiert, mit deren Hilfe eine für die GDO spezifische Gensonde amplifiziert werden sollte. Die Primer hatten folgende Sequenz:

„vorwärts Primer“: 5`-AARCCIYTITGGGARGT-3`

„rückwärts Primer“: 5`-GTICCIACCATICCRTC-3`

Mit den Primern und Gesamt-DNA des Stammes RW5 wurde eine PCR unter gering stringenten Bedingungen durchgeführt: Die Primer-Bindung erfolgte für 30 s bei einer Temperatur von 37°C. Dem Reaktionsansatz wurde außerdem 1 µl DMSO in ein Gesamtvolumen von 50 µl zugesetzt.

Die PCR ergab ein 1,2 kb großes PCR-Produkt, das in einen pCR-Script SK (+) Vektor kloniert wurde (Plasmid pJW23.2). Die Nukleotidsequenz dieses PCR Produktes beinhaltete u.a. die anhand der aminoterminalen Aminosäuresequenz vorhergesagte Nukleotidsequenz der aufgereinigten GDO, so daß das Plasmid pJW23.2 als spezifische Gensonde für die GDO eingesetzt werden konnte.

3.7.2 Klonierung und Sequenzierung des Gentisinsäure-1,2-Dioxygenase-Gens

Zur Klonierung des die GDO kodierenden Gens wurde ein Southern-Blot-Hybridisierungsexperiment mit *SfuI*-verdauter DNA des Stammes RW5 und der radioaktiv markierten Gensonde unter stringenten Bedingungen (60°C) durchgeführt. Diese *SfuI*-verdauten DNA des Stammes RW5 zeigte ein Signal mit einer ungefähren Größe von 4 kb. Daher wurde eine partielle Plasmid-Genbank aus *SfuI*-verdauter Gesamt-DNA des Stammes

RW5 hergestellt und in einem Kolonie-Hybridisierungsexperiment mit der GDO-spezifischen Gensonde nach Signalen untersucht. Aus der partiellen *SfuI*-Plasmid Genbank konnte ein Hybridplasmid (pJW39) isoliert werden, das mit der GDO-Gensonde hybridisierte und ein 4.103 bp großes *SfuI*-Fragment beinhaltete. Zellen des Stammes *E. coli* DH5a mit dem Plasmid pJW39 wurden in LB-Medium in Gegenwart von Ampicilin angezogen. Zellfreie Extrakte besaßen, im Gegensatz zu zellfreie Extrakten von *E. coli* DH5a ohne Plasmid pJW39, eine hohe spezifische Aktivität für die GDO.

3.7.3 Nukleotidsequenzanalyse des Plasmides pJW39

Beide Stränge der DNA des 4.103 bp großen Fragments des Plasmids pJW39 wurden sequenziert. Durch Analyse der Nukleotidsequenz mit dem Computerprogramm GeneWorks konnten 4 offene Leseraster (ORFs) identifiziert werden (Abbildung 8).

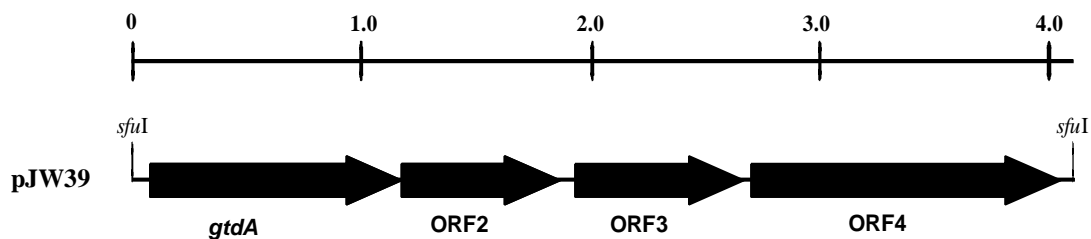


Abbildung 8: Offene Leseraster des Plasmids pJW39

ORF 1 konnte durch den Vergleich der vorhergesagten Aminosäuresequenz mit der aminoterminalen Sequenz der aus dem Stamm RW5 isolierten nativen GDO identifiziert werden. Das 1052 bp große Gen, *gtdA*, das 83 Basenpaare unterhalb der *SfuI*-Schnittstelle begann, kodiert für 350 Aminosäuren mit einer berechneten molekularen Masse von 38.85 kDa. Eine potentielle Shine-Dalgarno-Sequenz konnte sechs Basen oberhalb des Startkodons

lokalisiert werden. Eine Konsensussequenz für einen *E. coli* σ^{70} Promotor konnte oberhalb des Startkodons nicht nachgewiesen werden.

Die Aminosäuresequenz, die sich aus dem Gen *gtdA* ableiten läßt, wurde mit Aminosäuresequenzen bekannter Proteine aus den aktuellen Datenbanken des NCBI und EMBL (non-redundant GenBank DCS translations + PDB + SwissProt+ PDR) verglichen. Für das Genprodukt von *gtdA* konnte keine signifikante Homologie zu einem bisher bekannten Polypeptid, insbesondere zu keiner ringspaltenen Dioxygenase der intradiolischen (<13 %) oder extradiolischen (<13 %) Klasse, gefunden werden. Nur zu der 1-Hydroxy-2-Naphthoat-Dioxygenase (*phdI*) des Phenanthren-abbauenden Stammes *Nocardioides* sp. KP7 gab es eine geringe Sequenzhomologie von 27% (Iwabuchi und Harayama 1997). Diese Dioxygenase katalysiert die dioxygenolytische Ringspaltung von 1-Hydroxy-2-Naphthoat zu *trans*-2'-Carboxybenzalpyruvat und entspricht der Reaktion, die analog zur Ringspaltung von Gentisat zu Maleylpyruvat durch die GDO verläuft. Beide Enzyme spalten das Substrat zwischen der Carboxylgruppe am Kohlenstoffatom eins und der Hydroxylgruppe des Kohlenstoffatoms zwei und bilden dabei ein Derivat von Pyruvat. Auffällig ist, daß ein Abschnitt der GDO von 75 Aminosäuren, entsprechend der Numerierung der Aminosäurereste 94 bis 167, eine deutlich höhere Ähnlichkeit von 56% zu der Aminosäuresequenz der 1-Hydroxy-2-Naphthoat-Dioxygenase aufweist (Abbildung 9). Möglicherweise enthält diese Region der beiden Enzyme höher konservierte Regionen des aktiven Zentrums. Ein Vergleich der biochemischen Eigenschaften und des Reaktionsmechanismus der bisher nicht charakterisierten 1-Hydroxy-2-Naphthoat-Dioxygenase und der GDO wäre in diesem Zusammenhang von großem Interesse. Hierdurch könnte nachgewiesen werden, ob beide Enzyme letztendlich Vertreter einer Klasse von Dioxygenasen sind, wie es die Sequenzhomologie vermuten läßt (siehe auch Abbildung 10). Zur besseren Darstellung der phylogenetischen Stellung der GDO zu anderen ringspaltenen Dioxygenasen wurde exemplarisch ein phylogenetisches Dendrogramm erstellt, in dem die vorhergesagte Aminosäuresequenz von *gtdA* mit den vorhergesagten Aminosäuresequenzen verschiedener Dioxygenasen-Gene des intradiolischen Typs verglichen wird (Abbildung 10).

| | | | | | | |
|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| phd I | MNSSNTGAPE | AAQAATLEAF | DRRAAEQYLR | GQWIAEEHLM | RAIGGPRPAG | 50 |
| gtd A | MQPV-LANDQ | QAQLTAL--Y | DEMRPAG-LK | PLW----EVL | HALVLAEPAS | 42 |
| Consensus | M..... | .AQ...L... | D.....L. | ..W..... | .A....PA. | 50 |
| | | | | | | |
| phd I | IPYRWEWKS | EVA--LDEAT | IALGPVDTAR | RHLTFVNPGL | MDRGSATHT | 98 |
| gtd A | LARAHWHYG | EVRDFLLRSG | DLISAEQAER | RVLILENPGL | -EGSSAITPS | 91 |
| Consensus |W... | EV...L.... |R | R.L...NPGL |SA.T.. | 100 |
| | | | | | | |
| phd I | ISAGFQLVKP | GEVCWSHRHT | MSAVRFVTKG | HPDAFTAVDG | ERLPMEDFDL | 148 |
| gtd A | LYAGLQLILP | GEVAPCHRHT | QCALRFILEG | E-GAYTAVDG | EKAVMSPFDL | 140 |
| Consensus | ..AG.QL..P | GEV...HRHT | ..A.RF...G | ...A.TAVDG | E...M..FDL | 150 |
| | | | | | | |
| phd I | LITPRFSWHD | HHNSGDADV | WLDGLDIGLL | QSLGGVFYE- | ----- | 187 |
| gtd A | VLTPGGQWHD | HGNGTDQPMI | WLDGLDIPTV | RHFDASFAEK | WPQAQHPEMA | 190 |
| Consensus | ..TP...WHD | H.N..D.... | WLDGLDI... |F.E. | | 200 |
| | | | | | | |
| phd I | -P-----Y | DDSQNVRPSS | SEGIGTRSHW | LRPTWERG | SRLPIRYPWK | 230 |
| gtd A | PPGDSLARYG | HNLRPMRGTS | AD----R--- | -RPTSQ---- | -PL-FHYPYK | 226 |
| Consensus | .P.....Y |R..S |R... | .RPT..... | ..L...YP.K | 250 |
| | | | | | | |
| phd I | EVNARLDVYD | LDA-GTPYDG | LALRYANPVT | GGPTMATMDC | WVQRLAPG-- | 277 |
| gtd A | QWRPALDHLA | STAQVDPHLG | HALEFTNPAD | GGPVMETISA | HVRLIPRGME | 276 |
| Consensus |LD... | ..A...P..G | .AL...NP.. | GGP.M.T... | .V.....G.. | 300 |
| | | | | | | |
| phd I | ----- | -F---DGKSH | RRSSSDITYV | ISGSGTMVTE | DETITFNRGD | 313 |
| gtd A | TAPRRSTDGT | IFVVVEGKGQ | -----VE-- | IDGVSTRLS- | -----PR-D | 310 |
| Consensus | | .F....GK.. | | I.G..T.... |R.D | 350 |
| | | | | | | |
| phd I | VISLANWTNF | RWTNDSEIEP | VLLSSMNEIP | AFEASGLFYE | EPEEILNAKP | 363 |
| gtd A | VVVIPSWKRH | RFHAEDEL-- | IIF----- | GFSDKA---- | -CQQKL---- | 342 |
| Consensus | V.....W... | R.....E... | | .F..... |L.... | 400 |
| | | | | | | |
| phd I | APINPTPSFN | PIYRPGVFYD | QDDL | | | 387 |
| gtd A | ----- | -----GLF-R | EENL | | | 350 |
| Consensus | |G.F.. | ...L | | | 424 |

Abbildung 9: Vergleich der Aminosäuresequenzen von *gtdA* des Stammes RW5 und PhdI des Stammes *Nocardioides* sp. strain KP7

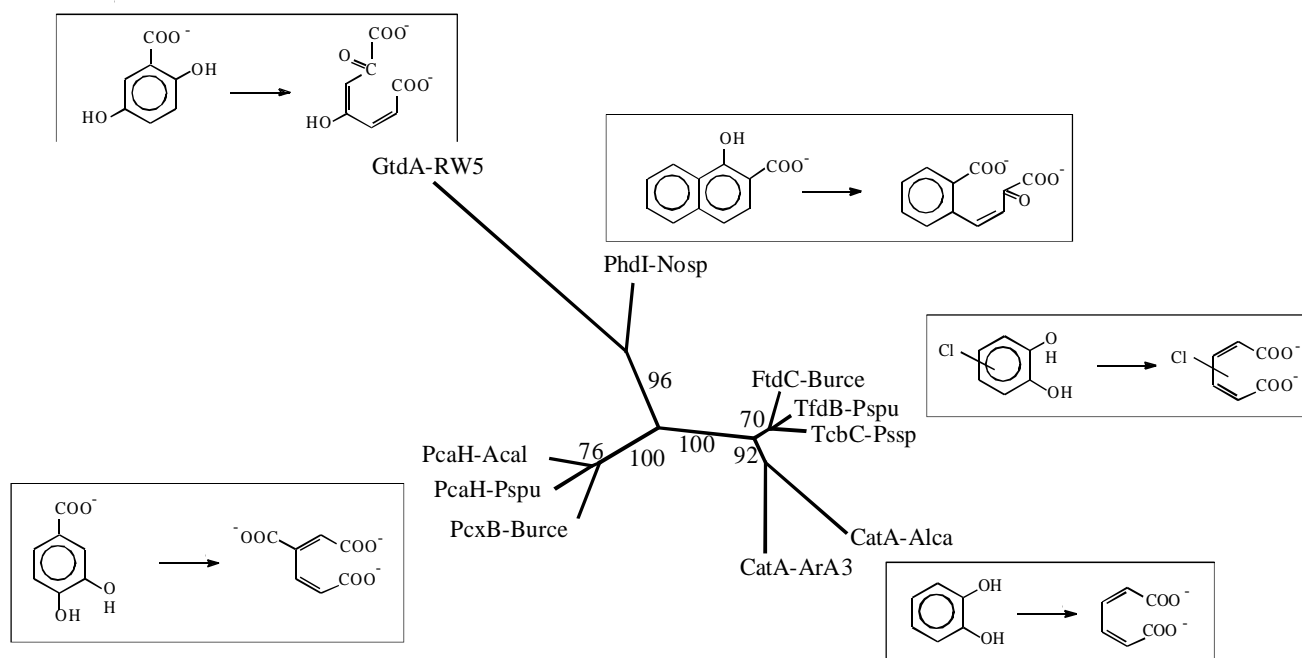


Abbildung 10: Phylogenetischer Stammbaum von *gtdA*

Unterhalb des *gtdA*-Gens wurden drei weitere ORFs gefunden. Alle ORFs besaßen potentielle Ribosomenbindungsstellen zwischen 6 und 9 Nukleotide von den jeweiligen Startkodons.

Weitere Analysen zeigten, daß ORF 2 mit den letzten vier Nukleotiden des *gtdA*-Gens überlappt und für ein Protein mit einer Größe von 25kDa kodiert. Die für ORF2 vorhergesagte Aminosäuresequenz zeigt signifikante Homologien zu mehreren ORFs bakteriellen Ursprungs, die für Enzyme mit einer Isomerase- oder Decarboxylasefunktion kodieren und möglicherweise katalytische Funktionen in Abbauwegen besitzen. Die höchsten Ähnlichkeiten wurden zu zwei ORFs des Dibenzo-*p*-Dioxin- und Dibenzofuran-abbauenden Stammes *Sphingomonas* sp. RW1 gefunden (**Tabelle 7**).

Tabelle 7: Ähnlichkeiten von bekannten Aminosäuresequenzen zur vorhergesagten Aminosäuresequenz von ORF 2 des Stammes RW5

| Ähnlichkeit (%) | Proteinsequenz von | Stamm | Referenz |
|--------------------|-----------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| 45 | ORF 2 | <i>Sphingomonas</i> sp. RW1 | (Armengaud und Timmis 1997) |
| 34 | ORF 1 | <i>Sphingomonas</i> sp. RW1 | (Armengaud und Timmis 1997) |
| 29 | ORF | <i>Methanococcus janashii</i> | (Bult et al. 1996) |
| 28 | HpcE | <i>Synechocystis</i> sp. | (Kaneko et al. 1996) |

Aufgrund dieser Homologien der vorhergesagten Aminosäuresequenz von ORF 2 zu Enzymen mit einer Isomerasefunktion katalysiert das Genprodukt von ORF 2 möglicherweise eine Isomerisierungsreaktion im Gentisinsäureabbauweg, wie sie zum Beispiel für die Isomerisierung von Maleylpyruvat zu Fumarylpyruvat bekannt ist (Crawford und Frick 1977). Bis zum tatsächlichen Nachweis der Funktion von ORF 2 bleibt dessen exakte Funktion unbekannt.

Das Startkodon von ORF 3 ist 5 Nukleotide unterhalb des Stopkodons von ORF 2 lokalisiert und kodiert ein Protein mit einer molekularen Masse von 28 kDa. Seine vorhergesagte Aminosäuresequenz zeigt die höchste Homologie zu zahlreichen Enzymen der Familie der Glutathion-S-Transferasen (GST, Tabelle 8).

Tabelle 8: Ähnlichkeiten von bekannten Aminosäuresequenzen zur vorhergesagten Aminosäuresequenz von ORF 3 des Stammes RW5

| Ähnlichkeit (%) | Proteinsequenz von | Stamm | Referenz |
|--------------------|-----------------------|-------------------------------------|-----------------------------|
| 32 | PcpC | <i>Sphingomonas chlorophenolica</i> | (Orser et al. 1993) |
| 27 | LigF | <i>Sphingomonas paucimobilis</i> | (Masai et al. 1993) |
| 25 | ParB | <i>Nicotiana tabacum</i> | (Takahashi und Nagata 1992) |

Obwohl die größte Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen nur 32% erreicht, sind insbesondere die Aminosäurereste, die bei allen Enzymen der alpha, pi, mu and theta Klasse der GST-Familie hoch konserviert sind, auch in der für ORF 3 vorhergesagten Aminosäuresequenz konserviert (Vuilleumier 1997).

Fuenmayor et al. (1998) konnten für den Naphthalin-abbauenden Stamm *Pseudomonas* sp. U2 ein Gen, das für ein Enzym der GST-Familie kodiert, unterhalb eines GDO-Gens finden. Da weder das GDO-Gen noch das GST-Gen von den Autoren bisher näher charakterisiert wurde, wäre zu überprüfen, ob es sich bei dieser Genanordnung um eine vergleichbare Anordnung wie die bei Stamm RW5 handelt. Möglicherweise könnte es sich bei dieser Genanordnung um ein wiederkehrendes Muster handeln.

Glutathion-S-Transferase kodierende Gene wurden in zahlreichen Operons oder Genklustern gefunden, deren Gene für Enzyme kodieren, die am Abbau von aromatischen Verbindungen beteiligt sind. Daher wurde vermutet, daß GSTs, die in Operons oder Gen-Klustern, die an der Ringspaltung und am weiteren Abbau aromatischer Verbindungen vorkommen, eine mögliche Rolle in diesen Abbauwegen spielen (Vuilleumier 1997). So kodiert das Gen BphK für ein Protein der GST-Familie, das CDNB als universelles Substrat für GSTs umsetzt. Es konnte aber nachgewiesen werden, daß BphK als einziges von 11 Genen im *bph*-Operon keine Funktion im Biphenyl-Abbau besitzt. (Hofer et al. 1994). Auch für ein ORF im *tft*-Operon, das für ein Enzym der Glutathion-Familie kodiert, konnte nachgewiesen werden, das es für die Mineralisierung von 2,4,5-Trichlorphenoxyessigsäure nicht notwendig ist (Daubaras et al. 1995). Andererseits wurde wiederholt für einige GSTs beschrieben, daß sie als Maleylacetat- oder Maleylacetoacetat-Isomerase arbeiten (Keen und Jacoby 1980; Seltzer 1989). Außerdem konnten Glutathion-abhängige Isomerasen in Abbauwegen aromatischer Verbindungen beschrieben werden. So zeigten Crawford and Frick (1977) z. B. für den Gentisat-Abbauweg des Stammes *Moraxella* eine Glutathion-abhängige Isomerisierung von Maleylpyruvat zu Fumarylpyruvat (Crawford und Frick 1977), aber die tatsächliche Beteiligung einer bestimmten bakteriellen GST an einer Isomerisierungsreaktion erfolgte bisher nicht. Lediglich für zwei GST-Gene konnten bisher die Funktionen bewiesen werden: Der Pentachlorphenol-abbauende Stamm *Sphingomonas chlorophenolica* (vormals *Flavobacterium*) führt die reduktive Dehalogenierung von 2,3,5,6-Tetrachlor-*p*-Hydroxyquinon in einer Glutathion-abhängigen Reaktion durch (Xun et al. 1992). Dieser Reaktionsschritt wird durch das Gen PcpC kodiert, das homolog zu anderen bakteriellen GSTs ist. Ein weiteres Gen, LigF des Stammes *Sphingomonas paucimobilis* (Masai et al. 1993), spaltet die Etherbindung in

Arylglycerol-*b*-Arylethern. Diesen beiden Genen gegenüber zeigt die GST aus ORF 3 die höchste Homologie. Es wäre daher von Interesse zu klären, ob das Genprodukt von ORF 3 möglicherweise eine Funktion im Gentisat-Abbauweg des Stammes RW5 besitzt.

Das Startkodon von ORF 4 liegt 31 Nukleotide unterhalb des Stopkodons von ORF 3 und kodiert für ein Protein mit einer molekularen Masse von 48 kDa. Die für ORF 4 vorhergesagte Aminosäuresequenz zeigt signifikante Homologien zu Glutathion-Reduktasen verschiedener Organismen (Tabelle 9). Unter anderem wurde eine Ähnlichkeit von 49 % zu TftF von *Burkholderia cepacia*, das am Abbau aus 2,4,5-Trichlorophenoxyacetat beteiligt ist, gefunden (Daubaras et al. 1995).

Tabelle 9: Ähnlichkeiten von bekannten Aminosäuresequenzen zur vorhergesagten Aminosäuresequenz von ORF 4 des Stammes RW5

| Ähnlichkeit (%) | Proteinsequenz von | Stamm | Referenz |
|--------------------|-----------------------|-----------------------------------|------------------------|
| 50 | gor-Gen | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | (Perry et al. 1991) |
| 49 | TftF | <i>Burkholderia cepacia</i> | (Daubaras et al. 1995) |
| 41 | gor-Gen | <i>Streptococcus thermophilus</i> | (Pebay et al. 1995) |

Die in allen Glutathion-Reduktasen hoch konservierten Aminosäuren wie die redoxaktiven Cysteine oder die Aminosäuren, die eine essentielle Rolle in der Bindung von NADPH oder dem Substrat Glutathiondisulphid spielen, waren auch in der für ORF 4 vorhergesagten Aminosäuresequenz konserviert. Eine mögliche physiologische Aufgabe des Genproduktes von ORF 4 könnte die Versorgung der von ORF 3 kodierten Glutathion-S-Transferase mit reduziertem Glutathion sein.

3.7.4 Klonierung und Sequenzierung der Region oberhalb von *gtdA*

Der oberhalb vom *gtdA*-Gen gelegene DNA-Bereich wurde auf die Präsenz weiterer Gene untersucht, die für am Abbau von 36DC2MBA bzw. 3,6-Dichlorsalicylat beteiligte Enzyme wie z.B. einer Salicylat-5-Hydroxylase, oder für Regulationsproteine bzw. Promotoren kodieren. Zur Klonierung eines solchen oberhalb von *gtdA* gelegenen DNA-Fragments wurde ein weiteres Southern-Blot-Hybridisierungsexperiment mit *EcoRI*-verdauter DNA des Stammes RW5 und der radioaktiv markierten Gensonde (pJW23.2) unter stringenten Bedingungen (60°C) durchgeführt.

Die *EcoRI*-verdaute DNA des Stammes RW5 zeigte ein Signal mit einer ungefähren Größe von 7 kb. Es wurde daher eine partielle Plasmid-Genbank aus *EcoRI*-verdauter Gesamt-DNA des Stammes RW5 hergestellt (siehe 2.5.5) und in einem Kolonie-Hybridisierungsexperiment mit der GDO-spezifischen Gensonde nach Signalen untersucht. Aus der partiellen *EcoRI*-Plasmid-Genbank konnte ein Hybridplasmid (pJW9) isoliert werden, das mit der GDO-Gensonde hybridisierte und ein 6.631 bp großes *EcoRI*-Fragment beinhaltet. Da durch die Nukleotid-Sequenzanalyse von *gtdA* bekannt war, daß nach 747 bp eine *EcoRI*-Schnittstelle liegt, kann ein Plasmid mit einem *EcoRI*-DNA-Fragment somit kein vollständiges *gtdA*-Gen enthalten. Erwartungsgemäß zeigten auch zellfreie Extrakte des Stammes *E. coli* DH5a mit dem Plasmid pJW9 keine Aktivität für dieses Enzym.

3.7.5 Sequenzanalyse der Region oberhalb von *gtdA* in pJW9

Beide Stränge der DNA des 6631-bp großen Fragments des Plasmides pJW9 wurden sequenziert. Durch Analyse der Nukleotidsequenz mit dem Computerprogramm GeneWorks konnten insgesamt 6 offene Leseraster (ORFs) identifiziert werden (Abbildung 11, Tabelle 10). Am 3'-Ende des Inserts wurden bis zur *EcoRI*-Schnittstelle erwartungsgemäß 747 bp von *gtdA* gefunden.

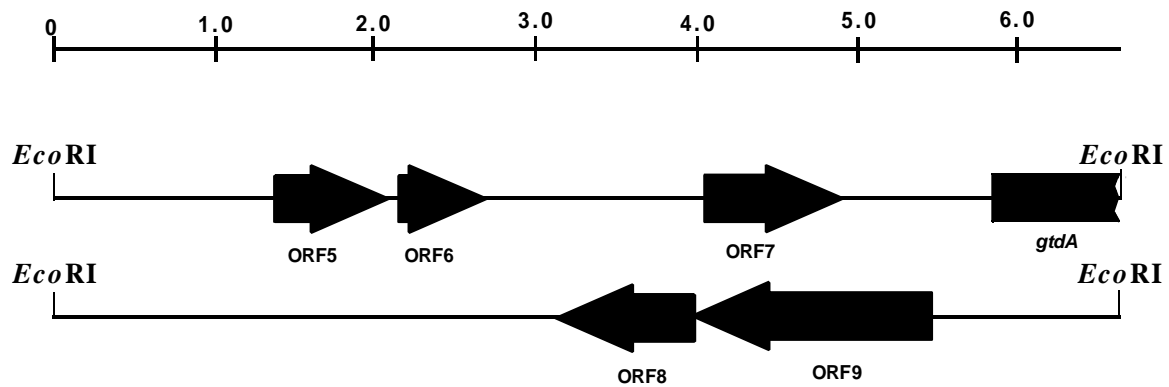


Abbildung 11: Offene Leseraster des Plasmids pJW9

Oberhalb des *gtdA*-Gens wurden fünf weitere ORFs gefunden. Alle ORFs besaßen potentielle Ribosomenbindungsstellen zwischen 5 und 9 Nukleotide vor den jeweiligen Startkodon. ORF 5 bis ORF 7 lagen in derselben Orientierung wie das *gtdA*-Gen vor; ORF 8 und ORF 9 lagen auf dem komplementären DNA-Strang, so daß sich ORF9 mit ORF 7 überlagerte.

Tabelle 10: Positionen der ORFs auf dem Insert von pJW9 und Größe der vorhergesagten Proteine

| ORF | Positionen der Nukleotide auf pJW9 | Größe des vorhergesagten Proteins (kDa) |
|-------|---------------------------------------|--|
| ORF 5 | 1381-2079 | 24 |
| ORF 6 | 2155-2697 | 19,5 |
| ORF 7 | 4046-4904 | 32 |
| ORF 8 | 3989-3132 | 32 |
| ORF 9 | 5473-3989 | 55 |

Die Aminosäuresequenzen, die sich aus den ORFs 5 bis 9 ableiten lassen, wurden mit Aminosäuresequenzen bekannter Proteine aus den aktuellen Datenbanken des NCBI und EMBL (non-redundant GenBank DCS translations + PDB + SwissProt+ PDR) verglichen. Für keines der Genprodukte aus diesen ORFs konnten signifikante Homologien zu einem bisher bekannten Polypeptid gezeigt werden. Die höchsten gefundenen Homologien zu anderen bekannten Polypeptiden lagen für alle ORFs unter 10%. Eine Konsensussequenz für einen *E. coli* σ^{70} Promotor oberhalb der Startkodons konnte nicht nachgewiesen werden. Ebenso war keine Homologie zu bisher bekannten Regulator-Genen nachweisbar.

Ein Vergleich der kürzlich veröffentlichten Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der großen und kleinen Untereinheit der Salicylat-5-Hydroxylase des Stammes *Pseudomonas* sp. U2 (Fuenmayor et al. 1998) konnte keine signifikante Homologie zu DNA-Abschnitten des Inserts von pJW9 bzw. zu den korrespondierenden, vorhergesagten Aminosäuresequenzen der ORFs zeigen. Die Salicylat-5-Hydroxylase katalysiert die Monooxygenierung von Salicylat zu Gentisat und ist somit am Reaktionsschritt vor der ringspaltenen Dioxygenierung von Gentisat durch die GDO beteiligt. Es wäre daher möglich, daß die Gene, die für die Salicylat-5-Hydroxylase kodieren, in einer modularen Anordnung direkt vor oder nach dem *gtdA*-Gen lokalisiert sind. Dieses kann jedoch aufgrund der Sequenzanalyse für den Stamm RW5 ausgeschlossen werden. Außerdem besaßen das Plasmid pJW9 enthaltende *E.coli* DH5a-Zellen keine Aktivität für eine Salicylat-5-Hydroxylase.

Zahlreiche Untersuchungen von Genen gram-positiver und gram-negativer Organismen, die für Enzyme aus Abbauwegen aromatischer Substanzen kodieren, haben gezeigt, daß viele dieser Gene in einem Gen-Cluster vorliegen, teilweise sogar mit einer streng konservierten Reihenfolge (vergleiche z. B.: das Bph-Operon (Hofer et al. 1994) oder das Nah-Operon (Yen 1982). Es wurde daher vermutet, daß sich diese Gencluster bzw. ihre letztendlich korrespondierenden Abbauwege in einer modularen Anordnung entwickelt haben (Armengaud und Timmis 1998).

So liegen auch die Gene aromatischer ringhydroxylierender Oxygenasen (z.B: des Bph-Operons, des Nah-Operons oder des Tod-Operons) in einer modularen Anordnung vor. In diesen bisher beschriebenen Genclustern liegen die große und kleine Untereinheit der ringhydroxylierenden Oxygenase, ein Ferredoxin sowie eine Reduktase (van der Meer 1997; Armengaud und Timmis 1998). Für den Dibenzo-*p*-Dioxin- und Dibenzofuran-abbauenden Stamm *Sphingomonas* sp. RW1 konnte eine atypische Genorganisation gezeigt werden. Die Gene des oberen Abbauweges für Dibenzofuran- und Dibenzo-*p*-Dioxinabbau sind auf

mehrere Genloci verteilt. So liegt z.B. das Gen *dbfB*, das für die 2,2',3-Trihydroxybiphenyl-1,2-Dioxygenase kodiert und den zweiten Reaktionsschritt des Dibenzofuran- und Dibenzo-*p*-Dioxinabbau katalysiert, 4,5 kb oberhalb des Genlokus in einer anderen Orientierung als die Untereinheiten der initialen Dioxin-Dioxygenase. Das Gen *dbfB* wird vermutlich sogar eigenständige und unabhängig von den Genen für die initiale Dioxygenase transkribiert (Armengaud et al. 1998). Außerdem konnte ein Ferredoxin kodierendes Gen *Fdx1* isoliert werden, das nicht in der Nachbarschaft der Dioxin-Dioxygenase-Gene lag, obwohl es als Elektronendonator für die Dioxin-Dioxygenase dient (Armengaud und Timmis 1997). Die Organisation der Gene des oberen Abbauweges von Dibenzo-*p*-Dioxin bzw. Dibenzofuran in *Sphingomonas* sp. RW1 ist somit deutlich anders, als es bisher für die Genanordnung bei anderen Stämmen beschrieben wurde. Es wird daher vermutet, daß die substantiell unterschiedliche Genorganisation von Enzymen des Abbaus polyzyklischer Aromaten in *Sphingomonas* sp. RW1 auf einer andersartigen Evolution dieser Gene basiert (Armengaud et al. 1998). Für den Stamm RW5 konnte gezeigt werden, daß die Gene, die für eine Salicylat-5-Hydroxylase kodieren, nicht oberhalb des Genlokus der GDO liegen. Ein regulatorisches Element konnte für diesen Genlokus nicht identifiziert werden. Daher liegt die Vermutung nahe, daß auch in Stamm RW5 ähnlich wie in *Sphingomonas* sp. RW1 eine atypische, nicht-modulare Genorganisation vorliegt. Möglicherweise stellt dieses ein generelles Merkmal von Organismen der Gattung *Sphingomonas* dar.

3.8 Charakterisierung der rekombinanten Gentisinsäure-1,2-Dioxygenase

3.8.1 Überexpression der rekombinanten Gentisinsäure-1,2-Dioxygenase

Um eine Aufreinigung der Gentisinsäure-1,2-Dioxygenase (GDO) zu erleichtern, sollte das Enzym in Zellen des Stammes *E.coli* überexprimiert werden. Hierzu wurde die rekombinante GDO nach Subklonierung in einem pT7-7 Überexpressionsvektor expremiert. Das die GDO kodierende Gen *gtdA* wurde mittels PCR unter Verwendung eines Paares synthetischer Oligonukleotidprimer amplifiziert: 5'-GGACATATGCAGCCAGTATTGGCCAATGATCAGC-3', der eine künstliche *NdeI* Restriktionsschnittstelle besaß (unterstrichen), und 5'-AAAGGATCCTCATAGATTTTCCTCTCGGAACAGC-3' mit einer künstlichen *BamHI* Restriktionsschnittstelle (unterstrichen). Mit Hilfe dieser Primer wurde direkt vor das Startkodon und hinter das Stopkodon eine künstliche Restriktionsschnittstelle eingefügt, so daß nur das für die GDO kodierende 1060 bp große DNA-Fragment in die analogen Restriktionsschnittstellen des pT7-7 Vektors subkloniert werden konnte. Das so gewonnene Plasmid pJW48 wurde in Zellen des Stammes *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Zellen dieses Stammes besitzen eine IPTG-induzierbare T7-Polymerase, die nach entsprechender Induktion das subklonierte DNA-Fragment expremieren. Das Plasmid pJW48 enthaltende Zellen des Stammes *E. coli* BL21(DE3) wurden in Gegenwart von 0.4 mM IPTG in LB-Medium angezogen. Zellfreie Extrakte besaßen eine spezifische Aktivität von 2.83 U/ mg für die GDO, wogegen induzierte, plasmidfreie *E. coli* BL21(DE3) Zellen eine spezifische Aktivität von weniger als 0.001 U/mg aufwiesen, also keine GDO besaßen.

3.8.2 Aufreinigung und Charakterisierung der in *E. coli* BL21 überexprimierten Gentisinsäure-1,2-Dioxygenase

Die in *E. coli* BL21 überexprimierte GDO sollte mittels FPLC zur Homogenität aufgereinigt und charakterisiert werden. Das Aufreinigungsprotokoll bestand aus mehreren Schritten: Einer Anionenaustauschchromatographie mittels einer selbstgepackten DEAE-Sepharose-Säule (Anionenaustausch-Chromatographie I), einer zweiten Anionenaustauschchromatographie mittels einer vorgepackten MonoQ-Säule (Anionenaustausch-Chromatographie II) und einer abschließenden Gelfiltration mittels einer vorgepackten Superdex 200-Säule. Die Ergebnisse

der Aufreinigung sind in Tabelle 11 dargestellt. Am Ende der Aufreinigung verblieben 1,7 % der ursprünglichen Aktivität der GDO bei einer 42-fachen Anreicherung.

Tabelle 11: Aufreinigung der überexprimierten Gentisinsäure-1,2-Dioxygenase

| Reinigungsschritt | Volumen (ml) | Protein (mg) | Gesamtaktivität (U) | spez. Aktivität (U/mg) | Wiederfindung (%) | Anreicherung (x-fach) |
|--------------------|-----------------|-----------------|------------------------|---------------------------|----------------------|--------------------------|
| Zellfreier Extrakt | 25 | 674,6 | 1,909 | 0,003 | 100,0 | 1 |
| DEAE-Sepharose | 12 | 120,7 | 1,344 | 0,011 | 70,4 | 3,9 |
| Mono Q | 3,5 | 13,1 | 0,828 | 0,063 | 43,4 | 22,4 |
| Gel-Filtration | 5,0 | 0,3 | 0,031 | 0,119 | 1,7 | 42,4 |

Nach jedem Chromatographie-Schritt wurden die Fraktionen einer Säule mit der höchsten Aktivität vereinigt und auf die nächste Säule aufgetragen.

Durch Vergleiche der Retentionszeiten während der Gelfiltration der GDO mit verschiedenen Proteinstandards konnte eine molekulare Masse für das Holoenzym von 178 ± 7.0 kDa ermittelt werden. Die GDO zeigte in der denaturierenden SDS-PAGE nur eine einzelne Bande mit einer Größe von $39 \text{ kDa} \pm 1.0 \text{ kDa}$ (Abbildung 12). Anhand der vorhergesagten Aminosäuresequenz konnte eine theoretische molekulare Masse von 38,85 kDa berechnet werden. Der Aufbau der GDO ist daher vermutlich homotetramer. Gleiche Ergebnisse konnten bereits für GDOs aus anderen Stämmen gezeigt werden. So wurde ein homotetramerer Aufbau der GDO bei folgenden Stämmen gefunden: Eine Untereinheit der GDO hatte bei *Arthrobacter* sp. GFB 100 eine molekulare Masse von 41,8 kDa (Chen 1993), bei *Comamonas testosteroni* ATCC 49249 von 40,8 kDa (Harpel und Lipscomb 1990), bei *Comamonas acidovorans* ATCC 17438 wurde sie mit einer molekularen Masse zwischen 37,2 und 39,8 kDa ermittelt (Harpel und Lipscomb 1990) und bei *Moraxella osloensis* war die molekulare Masse 40 kDa (Crawford et al. 1975). Dagegen wurde für den Gram-positiven Stamm *Rhodococcus erythropholis* S-1 ein homooktamerer Aufbau der GDO vermutet (Suemori et al. 1993). Das Holoenzym hat eine molekulare Masse von 328 kDa und ist vermutlich aus 8 Untereinheiten mit einer molekularen Masse von 43 kDa zusammengesetzt. Für die GDO aus *Bacillus stearothermophilus* PK1 konnte eine molekulare Masse von 260

kDa für das Holoenzym ermittelt werden (Kierner et al. 1996). Im SDS-PAGE konnte eine Untereinheit mit einer molekularen Masse von 40 kDa gezeigt werden, so daß diese GDO vermutlich homohexamerisch oder homoheptamerisch aufgebaut ist.

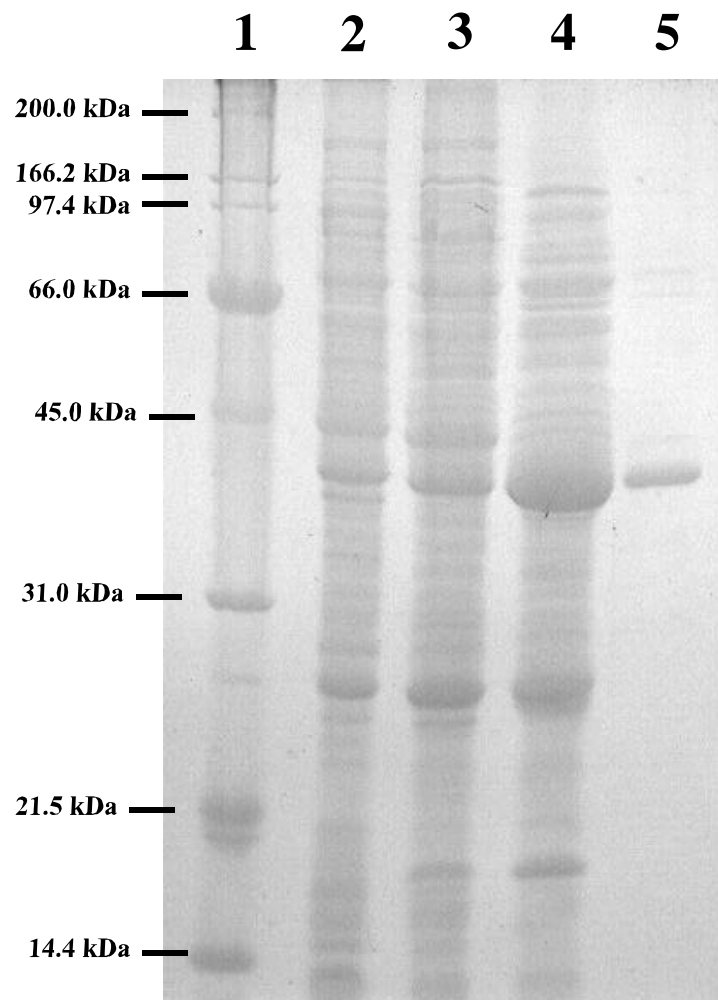


Abbildung 12: SDS-PAGE der aufgereinigten, rekombinanten GDO. Die FPLC-Proteinfractionen der jeweiligen Säulen wurden auf einem 12% Polyacrylamid Gel getrennt und mit Coomassie Blue R-250 gefärbt. Reihe 1: Proteinstandard (in kDa); Reihe 2: Proteinextrakt aus induzierten *E.coli* BL21 (DE3, pJW48) Zellen; Reihe 3: GDO-aktive Fraktion nach der DEAE-Sepharose-Säule; Reihe 4: GDO-aktive Fraktion nach der Mono Q-Säule; Reihe 5: GDO-aktive Fraktion nach der Gelfiltration

Mit Hilfe des Computerprogramms GeneWorks konnte anhand der bekannten Nukleotidsequenz ein isoelektrischer Punkt von 5,78 bestimmt werden. Dieser isoelektrische

Punkt entsprach den praktisch ermittelten Werten für die GDOs aus *Comamonas testosteroni* ATCC 49249 (Harpel und Lipscomb 1990) und *Arthrobacter* sp. GFB100 (Chen 1993).

Das pH-Optimum für die Enzymaktivität in verschiedenen Puffersystemen wie Tris-HCl oder Phosphatpuffern lag bei einem pH-Wert von 7,0 und zeigte ein breites Aktivitätsmaximum zwischen einem pH-Wert von 6,8 und 8,0. Die Aktivität nahm bei einem pH-Wert unterhalb von 6,0 und oberhalb von 8,0 merklich ab.

Die gereinigte GDO war extrem instabil: sie verlor innerhalb von zwei Wochen rund 70% ihrer ursprünglichen Aktivität bei einer Lagerung bei -70°C und innerhalb von 72 h 90% ihrer ursprünglichen Aktivität bei einer Lagerung bei 4°C . Die Aktivität konnte durch die Zugabe von für andere Proteine stabilisierend wirkenden Reagenzien wie DTT (1mM), Ethanol (10%), PefaBlock (1mM) und Eisen⁽²⁺⁾sulfat (100nM) nicht merklich gesteigert werden. Temperaturen oberhalb von 60°C , sowie Ammoniumsulfatkonzentrationen von mehr als 10% (g/v) inaktivierten die GDO vollständig. Eine geringe Stabilität aufgereinigter GDOs wurde bereits für die GDO aus *Klebsiella pneumoniae* M5a1 beschrieben (Suarez et al. 1996). Diese GDO verlor ihre Aktivität bei 4°C innerhalb von 48 h vollständig und nach Lagerung bei -20°C in 20% Glycerol verblieben nach 96 h noch 25% der Aktivität. Dagegen besaßen die GDOs aus *Comamonas testosteroni* und *Comamonas acidovorans* bei Lagerung in flüssigem Stickstoff nach einem Jahr noch 85% ihrer ursprünglichen Aktivität (Harpel und Lipscomb 1990). Diese GDOs behielten allerdings nur dann ihre Stabilität, wenn während der Aufreinigung Fe^{2+} und Cystein als stabilisierende Agenzien den Puffern zugesetzt wurden. Ansonsten verloren auch diese GDOs schnell ihre Aktivität, die nur partiell durch anschließende Zugabe von Fe^{2+} -Ion wiederhergestellt werden konnte (Harpel und Lipscomb 1990; Harpel und Lipscomb 1990). Mehrere Autoren berichten, daß Eisenionen für den Erhalt der Aktivität der GDO notwendig sind (Sugiyama et al. 1958; Crawford et al. 1975; Suarez et al. 1996). Die Eisenionen sind bei vielen Fe^{2+} -haltigen Enzymen wie z.B. den extradiospaltenen Dioxygenasen durch hoch konservierte Aminosäureliganden gebunden (Eltis und Bolin 1996). Außerdem können Fe^{2+} -Ionen in eisenhaltigen Co-Faktoren gebunden sein, z.B. durch eine Häm-Gruppe oder einen sog. Schwefel-Eisen-Komplex, wie es für die Ringhydroxylierenden Dioxygenasen bekannt ist (Mason und Cammack 1992). Harpel und Lipscomb konnten jedoch mittels EPR-Studien nachweisen, daß das Fe^{2+} im aktiven Zentrum der GDO weder durch einen Co-Faktor gebunden ist, noch durch Elektronen-spendenden Liganden, wie z.B. Histidin oder Tyrosin, gebunden wird (Harpel und Lipscomb 1990; Harpel und Lipscomb 1990). Durch die Sequenzanalyse des *gtdA*-Gens aus Stamm RW5 konnte

bestätigt werden, daß tatsächlich keine geeigneten Elektronen-spendenden Liganden wie z.B. Histidin oder Tyrosin als geeignete Liganden vorhanden sind. Wahrscheinlich werden daher die Eisenionen direkt an das organische Substrat gebunden und dadurch ist das Fe^{2+} ein nur schwach gebundener Co-Faktor, der während der Aufreinigung der GDO leicht aus dem aktiven Zentrum entfernt wird. Der Verlust von Fe^{2+} könnte daher ein möglicher Grund für die beobachtete Instabilität der GDO des Stammes RW5 sein.

3.8.3 Identifizierung von Maleylpyruvat als Produkt der dioxygenolytischen Ringspaltung von Gentisinsäure durch die Gentisinsäure-1,2-Dioxygenase

Das Reaktionsprodukt aus der dioxygenolytischen Ringspaltung von Gentisinsäure durch die GDO konnte in früheren Publikationen nur durch ein UV-Spektrum als Maleylpyruvat identifiziert werden (Lack 1959). Daher sollte Maleylpyruvat durch ein Massenspektrum als das tatsächliche Reaktionsprodukt identifiziert werden. Zur Identifizierung wurde daher eine 1mM Gentisinsäurelösung stöchiometrisch mittels der aufgereinigten GDO umgesetzt. Dabei entstand ein Produkt, dessen Absorptionsspektrum ein für Maleylpyruvat typisches Maximum von 330nm besaß (Lack 1959).

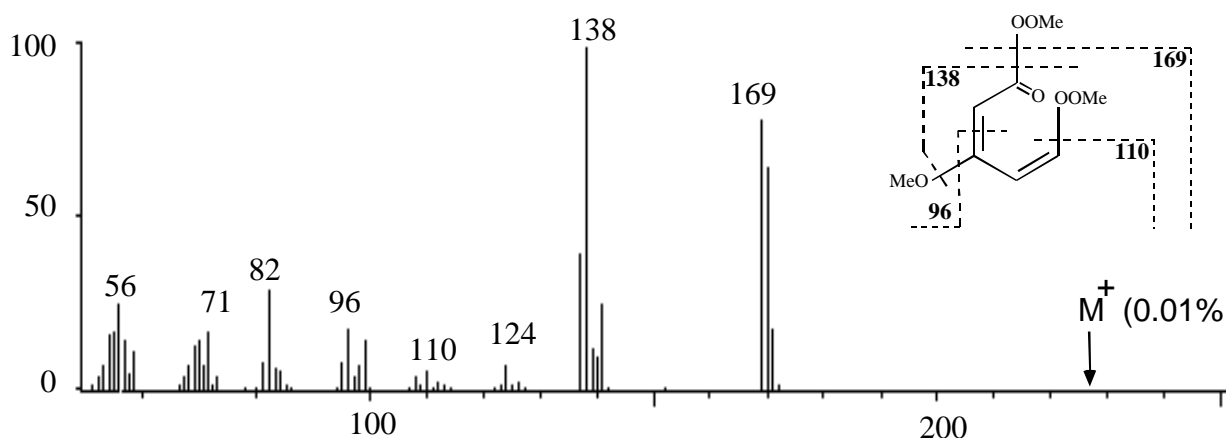


Abbildung 13: Massenspektrum (70eV) von Trimethylsulfoniumhydroxid-derivatisiertem Maleylpyruvat

Wegen der bekannten Instabilität von Maleylpyruvat während der Extraktion mit organischen Lösungsmitteln aus sauren, wässrigen Puffersystemen (Lack 1961) wurde die nachfolgende Derivatisierung des Reaktionsproduktes mit TSMH direkt im wässrigen Puffersystem durchgeführt und nach Evaporation des Puffers und anschließender GC-Trennung ein Massenspektrum aufgezeichnet (Abbildung 13). Das Fragmentierungsmuster entsprach dem für Maleylpyruvat Vorhergesagten. Das Signal für das Molekül-Ion ($m/z = 228$) war sehr schwach ($<0,1\%$), da eine $-\text{COOCH}_3$ -Gruppe direkt abgespalten wurde. Es entstanden zwei Signale bei $m/z = 169$ und $m/z = 59$. Das Basissignal hatte durch die weitere Abspaltung einer $-\text{OCH}_3$ -Gruppe ein Molekulargewicht von 138. Weitere Fragmente konnten durch die Abspaltung der zweiten COOCH_3 -Gruppe ($m/z = 110$), einer COCH_3 -Gruppe ($m/z = 96$) und einer CO-Gruppe ($m/z = 82$) nachgewiesen werden.

3.8.4 Kinetische Charakterisierung der Gentisinsäure-1,2-Dioxygenase

Zur Charakterisierung des Umsatzes der Gentisinsäure-1,2-Dioxygenase wurden die K_m -Werte der GDO mit Gentisinsäure ($0,5 - 200 \mu\text{M}$) und 3,6-Dichlorgentisinsäure ($30-3000 \mu\text{M}$) als Substrat in sauerstoffgesättigtem Puffer aufgenommen. Die Kinetiken der GDO verliefen wie erwartet als reine Michaelis-Menten Kinetiken. Die K_m -Werte wurden durch nicht-lineare Regression ermittelt. Der K_m -Wert für Gentisinsäure war $15 \mu\text{M}$, die maximale Geschwindigkeit V_{\max} 119 U/mg und das K_{cat}/K_m -Kriterium war $511 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1} \times 10^4$.

Für 3,6-Dichlorgentisinsäure lag der K_m -Wert 50-fach höher ($754 \mu\text{M}$) als für die unchlorierte Gentisinsäure bei, die maximale Geschwindigkeit V_{\max} bei 233 U/mg und das K_{cat}/K_m -Kriterium war $20 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1} \times 10^4$.

Der K_m -Wert für Gentisinsäure als Substrat, der hier für die GDO des Stammes RW5 ermittelt wurde, ist zweifach höher als der für den Stamm *Moraxella osloensis*, der mit $7,1 \mu\text{M}$ beschrieben wurde (Crawford et al. 1975). Er war aber vier bis fünfmal niedriger als für die K_m -Werte, die für die Stämme *Comamonas testosteroni* ($85 \mu\text{M}$), *Comamonas acidovorans* ($74 \mu\text{M}$) oder *Klebsiella pneumoniae* M5a1 ($52 \mu\text{M}$) beschrieben wurden (Harpel und Lipscomb 1990; Harpel und Lipscomb 1990; Suarez et al. 1996). Das K_{cat}/K_m -Kriterium der GDO aus RW5 für Gentisat als Substrat war ungefähr gleich hoch wie die der GDOs aus *Comamonas testosteroni* ($430 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1} \times 10^4$) und *Comamonas acidovorans* ($435 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1} \times 10^4$) (Harpel und Lipscomb 1990; Harpel und Lipscomb 1990). Die K_m -Werte des Stammes RW5 entsprachen

außerdem den Fe^{2+} -haltigen Catechol-2,3-Dioxygenasen, die unter atmosphärischen Sauerstoffkonzentrationen gemessen wurden (Harpel und Lipscomb 1990).

Die Betrachtung des $K_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ -Kriteriums der GDO des Stammes RW5 für Gentisinsäure und 3,6-Dichlorgentisinsäure als Substrat zeigt, daß auch das chlórsubstituierte Substrat von der GDO gebunden und umgesetzt wird. Dies geschieht allerdings mit einer 25-fach geringeren Effizienz als für Gentisinsäure, wie aus dem Vergleich der $K_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ -Kriterien für beide Substrate hervorgeht. Die Stämme *Comamonas testosteroni* und *Comamonas acidovorans* wurden auf den Umsatz substituierter Gentisate untersucht. Beide Stämme konnten Chlor- und Fluorgentisate, die in 3- oder 4-Position substituiert waren umsetzen. *Comamonas acidovorans* konnte sogar 3- und 4-Methylgentisat umsetzen (Harpel und Lipscomb 1990). Der K_{m} -Wert für 3,6-Dichlorgentisat als Substrat lag allerdings 15- bis 25-fach höher als die K_{m} -Werte, die für 3-Chlor- und 4-Chlorgentisate bei *Comamonas testosteroni* und *Comamonas acidovorans* ermittelt wurden.

3.9 Versuch zur Überexpression der rekombinanten ORFs 2-4 von Plasmid pJW39

Um eine biochemische Analyse der Genprodukte der ORFs2-4 zu ermöglichen, sollten diese in Zellen des Stammes *E. coli* überexprimiert werden. Hierzu wurden die rekombinanten ORFs durch Subklonierung in einen pT7-7 bzw. pT7-5 Überexpressionsvektor entsprechend der Strategie zur Überexpression von *GtdA* expremiert. Die kodierenden DNA-Sequenzen für die ORFs wurden mittels PCR unter Verwendung von jeweils eines Paares synthetischer Oligonukleotidprimer amplifiziert (siehe Anhang). Mit Hilfe dieser Primer wurden für die ORFs 2 und 3 direkt vor die Startkodons und hinter die Stopkodons künstliche Restriktionsschnittstellen eingefügt, so daß nur das für die ORFs kodierende DNA-Fragment in die analogen Restriktionsschnittstellen des Überexpressionsvektors subkloniert werden konnte. Da ORF 4 eine interne *NdeI* Restriktionsschnittstelle besitzt, wurde ein Primer mit einer künstlichen *EcoRI* Restriktionsschnittstelle verwendet, der ungefähr 40 Basenpaare oberhalb des Startkodons ansetzte und dadurch die natürliche Shine-Delgarno-Sequenz von ORF 4 mitamplifizierte. Das PCR-Produkt aus dieser Amplifikation wurde, anders als für die ORFs2 und 3, nicht in einen pT7-7-Vektor, sondern in einen entsprechend vorverdauten pT7-5-Vektor ligiert. Zusätzlich wurde ein Konstrukt erstellt, daß alle drei ORFs hintereinander trug. Aufgrund der internen *NdeI* Restriktionsschnittstelle von ORF 4 wurde hier dieselbe Strategie, wie zur Klonierung von ORF 4 verwendet. Die Plasmide pJW54 (mit ORF2),

pJW55 (mit ORF3), pJW61 (mit ORF4) und pJW64 (mit ORF 2-4) wurden in Zellen des Stammes *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Zellen des Stammes *E. coli* BL21(DE3) mit den Hybrid-Plasmiden wurden in Gegenwart von 0.4 mM IPTG in LB-Medium angezogen und zellfreie Extrakte dieser Zellen auf Überexpression von Proteinen in der SDS-PAGE untersucht (Abbildung 14).

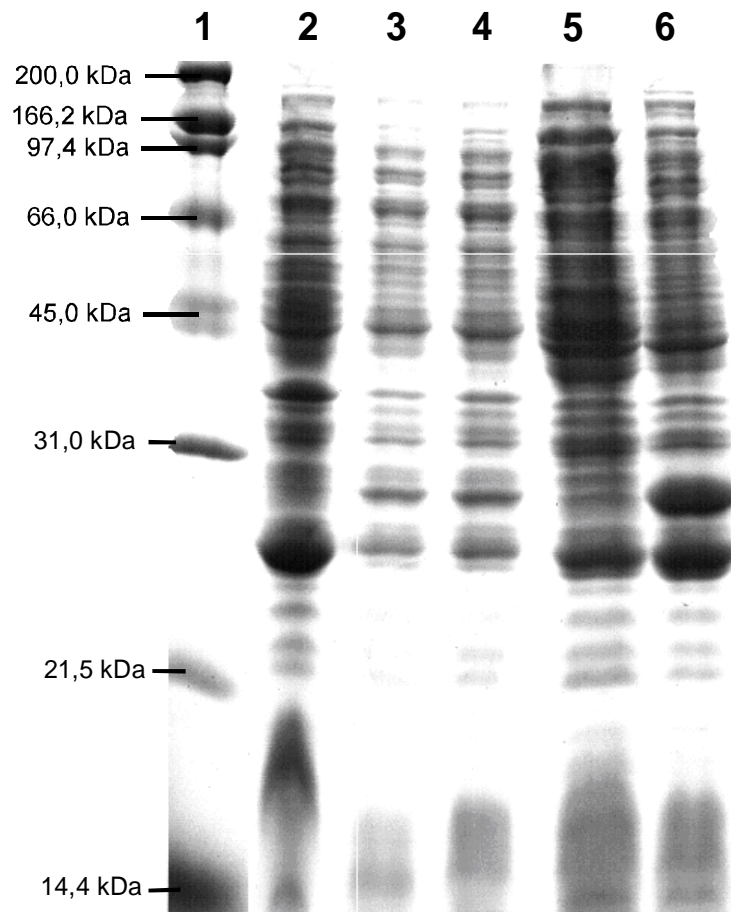


Abbildung 14: SDS-PAGE von zellfreien Extrakten induzierter Zellen von *E. coli* BL21(DE3) mit den Plasmiden pJW54 (ORF 2), pJW55 (ORF 3), pJW61 (ORF 4) und pJW64 (ORFs 2-4). Die zellfreien Extrakte wurden auf einem 12% Polyacrylamid Gel getrennt und mit Coomassie Blue R-250 gefärbt. Reihe 1: Proteinstandard (in kDa); Reihe 2: Proteinextrakt aus induzierten *E.coli* BL21 (DE3, pJW61) Zellen; Reihe 3: Proteinextrakt aus induzierten *E.coli* BL21 (DE3, pJW55) Zellen; Reihe 4 Proteinextrakt aus induzierten *E.coli* BL21 (DE3, pJW54) Zellen; Reihe 5 Proteinextrakt aus induzierten *E.coli* BL21 (DE3) Zellen; Reihe 6: Proteinextrakt aus induzierten *E.coli* BL21 (DE3, pJW64) Zellen

Für das Genprodukt von ORF 2 wurde ein Protein mit einer kalkulierten molekularen Masse von 25.14 kDa erwartet. Zellfreie Extrakte induzierter Zellen von *E. coli* BL21(DE3) ohne ein

Plasmid zeigten in der SDS-PAGE eine Bande bei ca. 28 kDa. Trotz der schlechten Bildqualität des gedruckten SDS-Gels konnte im Original-Gel festgestellt werden, daß diese Bande bei zellfreien Extrakten induzierter Zellen von *E. coli* BL21(DE3, pJW54) geringfügig verstärkt war. Eine eindeutige Überexpression eines Proteins konnte dennoch nicht nachgewiesen werden. Die Analyse der vorhergesagten Aminosäuresequenz von ORF 2 zeigte signifikante Homologien zu mehreren ORFs bakteriellen Ursprungs, die Enzyme mit einer Isomerase- oder Decarboxylasefunktion kodieren. Da die anhand der vorhergesagten Aminosäuresequenz errechnete molekulare Masse nicht immer mit der nach der Trennung in der SDS-PAGE übereinstimmt, wurde untersucht, ob das überexprimierte Protein von ORF 2 möglicherweise die Isomerisierungsreaktion von Maleylpyruvat zu Fumarylpyruvat katalysiert, wie sie für den Gentisat-Abbauweg beschrieben wurde (Lack 1959; Lack 1961). Zellfreie Extrakte induzierter Zellen von *E. coli* BL21(DE3, pJW54) zeigten allerdings keine Aktivität für eine Maleylpyruvat-Isomerase. Da die Expression des Proteins von ORF2 nicht erfolgreich war, wurden die Bedingungen zur Induktion der Zellen von *E. coli* BL21(DE3, pJW54) verändert, indem die Zellen mit 1 mM IPTG für 1 h inkubiert wurden. Dieses hatte allerdings nach Auswertung von SDS-PAGE und Enzymtests keine Erhöhung der Expression zur Folge. Die induzierten Zellen wurden darüberhinaus auf die Bildung von Einschußkörpern untersucht, die bei der Expression heterologer Proteine häufig vorkommt (Sambrook et al. 1989) und z.B. bei der Expression α -Untereinheit der hybriden, initialen Biphenyl-Dioxygenase aus *Burkholderia* sp. LB400 / *Rhodococcus globerulus* P6 auftrat (Hofer, pers. Mitteilung). Einschußkörper wurden bei der Überexpression von ORF 2 jedoch nicht gebildet.

ORF 3 kodiert für ein Protein mit einer molekularen Masse von 28 kDa. Die Auswertung in der SDS-PAGE ergab, daß bei zellfreien Extrakten induzierter Zellen von *E. coli* BL21(DE3, pJW55) eine Bande bei ca. 28 kDa geringfügig verstärkt war, wie es auch für zellfreie Extrakte induzierter Zellen von *E. coli* BL21(DE3, pJW54) beobachtet worden war. Eine eindeutige Überexpression eines Proteins konnte nicht nachgewiesen werden. Durch eine Induktion der Zellen mit 1 mM IPTG für 1 h konnte, wie für die Expression des ORF 2, keine Erhöhung der Expression erreicht werden. Einschußkörper wurden bei der Überexpression von ORF 3 ebenfalls nicht gebildet.

Die Sequenzanalyse der vorhergesagten Aminosäuresequenz von ORF 3 zeigte signifikante Homologien zu Enzymen der Familie der Glutathion-S-Transferasen (GST). Zellfreie Extrakte induzierter Zellen von *E. coli* BL21(DE3, pJW55) sollten daher auf Aktivität für eine GST

untersucht werden. Dieser Aktivitätstest wurde mit 2,4-Dinitrobenzol (CDNB) als möglichst universellem Substrat für GSTs durchgeführt (Habig und Jakoby 1981). Für induzierte, zellfreie Extrakte von *E. coli* BL21(DE3, pJW55) konnte durch diesen Test jedoch keine Aktivität für eine GST gemessen werden. Es ist allerdings bekannt, daß insbesondere Enzyme der theta-Klasse der GST-Familie nicht mit CDNB detektiert werden können (Vuilleumier 1997). Möglicherweise ist eine fehlende physiologische Aktivität des expremierten Proteins von ORF 3 darauf zurückzuführen, daß CDNB nicht als Substrat genutzt werden kann.

Bei der Expression von ORF 4 wurde ein Protein mit einer kalkulierten molekularen Masse von 48 kDa erwartet. Zellfreie Extrakte induzierter Zellen von *E. coli* BL21(DE3) ohne ein Plasmid zeigten in der SDS-PAGE eine Bande bei ca. 35 kDa. Diese Bande war bei zellfreien Extrakten induzierter Zellen von *E. coli* BL21(DE3, pJW61) geringfügig verstärkt, aber es konnte wie schon bei der Expression der ORFs 2 und 3 keine eindeutige Überexpression eines Proteins nachgewiesen werden. Es wurden keine Einschußkörper gebildet, und die Überexpression ließ sich durch die Veränderung der oben beschriebenen Induktionsbedingungen nicht erhöhen.

Im Gegensatz zur Überexpression der einzelnen ORFs konnte bei der Überexpression der ORFs 2 bis 4 in einem Plasmid (pJW64) eine deutliche Bande mit einer ungefähren molekularen Masse von 28 kDa nachgewiesen werden. ORF 3 kodiert für ein vorhergesagtes Protein mit einer molekularen Masse von 28 kDa und ORF 2 für ein vorhergesagtes Protein mit einer berechneten molekularen Masse von 25 kDa. Da das Laufverhalten von Proteinen in der SDS-PAGE nicht immer mit der vorhergesagten molekularen Masse übereinstimmt, können diese Banden nicht eindeutig der Expression eines ORFs zugeordnet werden. Denkbar wäre, daß z.B. nur das ORF 2 transkribiert wird und die Transkription danach gestoppt wird, oder daß die ORFs 2 und 3 transkribiert werden und die Genprodukte sich bei der Auftrennung in der SDS-PAGE überlagerten. Eine Sequenzierung des aminoterminalen Endes der Proteine der 35 kDa-Bande könnte diese Frage klären. Eine weitere zusätzliche Bande, z.B. für ein Genprodukt von ORF 4 bei 48 kDa, war nicht vorhanden. Es muß daher angenommen werden, daß ORF 4 nicht gleichzeitig transkribiert worden ist. Zellfreie Extrakte induzierter *E. coli* BL21(DE3, pJW64)-Zellen wurden auf Enzymaktivität für eine Maleylpyruvat-Isomerase sowie GST untersucht, es konnte jedoch für beide Enzyme keine Aktivität ermittelt werden.

Für eine fehlerhafte Expression heterologer Proteine gibt es eine Vielzahl möglicher Ursachen: Die Auswahl eines geeigneten Promotors kann entscheidenden Einfluß auf die Transkription haben und eine Ribosomen-Bindungsstelle (RBS) muß mitkloniert werden. Im vorliegenden Fall wurde bei der Klonierung von *gtdA* und den ORFs 2 und 3 eine künstliche, für *E. coli* optimierte RBS durch die Verwendung synthetischer Primer vor das jeweilige Gen eingefügt. Die klonierten Gene standen außerdem unter Kontrolle des T7-Polymerase-Promotors, der von *E. coli* erkannt wird, so daß diese Ursachen für die fehlende Expression der ORFs ausscheiden, was durch die erfolgreiche Überexpression von *gtdA* gezeigt werden konnte. Prinzipiell kann eine erfolglose Überexpression der ORFs aus Stamm RW5 in *E. coli* auch auf einer unterschiedlichen Übersetzung des Basen-Triplets in die korrespondierenden Aminosäuren (sog. „Codon-usage“) beruhen. Da bis heute keine statistisch abgesicherte Codon-Usage für Organismen der Gattung *Sphingomonas*, z.B. in der „Codon-Usage-Database“ des National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MA, USA, veröffentlicht wurde, wurden die Triplets der ORFs 2 bis 4 mit der Codon-Usage von *E. coli* verglichen. Es konnten aber keine Hinweise gefunden werden, daß für *E. coli* seltene Codons vermehrt von Stamm RW5 genutzt wurden.

Eine fehlende Expression von heterologen Proteinen kann weiterhin auf die Instabilität der gebildeten mRNA zurückzuführen sein. Möglicherweise beinhaltet die DNA-Sequenz eines der ORFs eine Restriktionsschnittstelle, die von *Sphingomonas* nicht erkannt wird, in *E. coli* jedoch zu einem Abbau der mRNA führt. Auch eine Instabilität des transkribierten Proteins könnte eine mögliche Fehlerursache sein. Z. B. können bestimmte Signalsequenzen am C-terminalen Ende der Aminosäurekette zu einem Abbau des Proteins aus *Sphingomonas* in *E. coli* führen. So führte eine Signalsequenz von 7 Aminosäuren z.B. bei der Überexpression des Gens *bphC* aus *Burkholderia cepacia* LB400 in *E. coli* zu einem Abbau des transkribierten Genproduktes (Zielinski, pers. Mitteilung). Auch die Faltung der Aminosäurekette in die Tertiärstruktur ist eine weitere mögliche Fehlerquelle. Für das „Green-Fluorescent-Protein“ (GFP) ist bekannt, daß es zur korrekten Faltung der Aminosäuresequenz molekularen Sauerstoff benötigt (Chalfie 1995). Möglicherweise ist eine solche fehlerhafte Faltung der Aminosäurekette in *E. coli* ein Grund für die geringe Überexpression der ORFs. Es ist daher notwendig, die Überexpression der ORFs mit anderen Überexpressionssystemen z.B. in Zellen

des Stammes *Pseudomonas* sp. zu wiederholen. Dadurch könnten sich eventuell einige der angesprochenen Fehlerursachen ausschließen lassen.

4 Zusammenfassung

Der Stamm RW5 wurde mit 3,6-Dichlor-2-methoxybenzoat (36DC2MBA) als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle aus aeroben Sedimenten des Flusses Elbe isoliert und durch Analyse der 16S rDNA als *Sphingomonas* sp. identifiziert. Der Stamm RW5 konnte 36DC2MBA und 3,6-Dichlorsalicylat vollständig mineralisieren und bildete während der exponentiellen Wachstumsphase mit beiden Verbindungen jeweils einen Metaboliten, der als 3,6-Dichlorgentisat identifiziert werden konnte. Außerdem konnte der Stamm 3,6-Dichlorgentisat, nicht aber 3,6-Dichlorbrenzkatechin als Kohlenstoff- und Energiequelle verwerten. Sauerstoffaufnahme- und Wachstumsraten 36DC2MBA-gewachsener Zellen zeigten dementsprechend signifikante Aktivitäten für 36DC2MBA, 3,6-Dichlorsalicylat und 3,6-Dichlorgentisat, dagegen nur sehr geringe Aktivitäten für 3,6-Dichlorbrenzkatechin und keine für Brenzkatechin. In zellfreien Extrakten des Stammes war eine hohe spezifische Aktivität für eine Gentisinsäure-1,2-Dioxygenase nachzuweisen, die auch 3,6-Dichlorgentisat umsetzen konnte, wogegen Aktivitäten für eine Salicylat-5-Hydroxylase und eine der Brenzkatechin-Dioxygenasen nicht nachweisbar waren. Maleylpyruvat wurde von zellfreien Extrakten des Stammes RW5 in einer Glutathion-abhängigen Reaktion vollständig umgesetzt. Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß der Stamm RW5 36DC2MBA über einen (Chlor)-Gentisat-Weg abbaut.

Das Gen, das für eine Gentisinsäure-1,2-Dioxygenase (GDO) kodiert, sollte identifiziert und charakterisiert werden. Dazu wurde ein 4.103 bp großes, das GDO-Gen enthaltende DNA-Fragment aus einer Plasmidbank von *Sphingomonas* sp. RW5 kloniert und sequenziert. Das Gen *gtdA* kodiert für ein 350 Aminosäuren großes Protein mit einer berechneten Größe von 38,85 kDa. Sequenzvergleiche der vorhergesagten Aminosäuresequenz von *gtdA* zeigten keine signifikanten Homologien (jeweils <13%) zu bisher bekannten Proteinsequenzen ringspaltenender Dioxygenasen des intradiolen- und extradiolen Typs. Die GDO stellt somit ein Vertreter einer neuen Klasse ringspaltenender Dioxygenasen dar. Das Gen *gtdA* wurde subkloniert, in *E.coli* überexprimiert und die rekombinante GDO mittels FPLC aufgereinigt. Mittels Gelfiltration konnte eine molekulare Masse von ca. 177 kDa für das Holoenzym ermittelt werden. Unter denaturierenden Bedingungen konnte in der SDS-PAGE eine Bande mit einer molekularen Masse von 38,5 kDa erhalten werden. Die GDO besteht daher aus Untereinheiten, die ein Homotetramer bilden. Das gereinigte Enzym setzte Gentisat zu

stöchiometrischen Mengen Maleylpyruvat um, dessen Struktur mittels GC-MS-Analytik als ihr Methylester identifiziert werden konnte. Die Werte für K_m und K_{cat}/K_m des Enzyms waren 15 μM und $511 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1} \times 10^4$ für Gentisat bzw. 754 μM bzw. $20 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1} \times 10^4$ für 3,6-Dichlorogentisat. Somit wird auch das chlorierte Substrat von der GDO gebunden und produktiv umgesetzt.

Unterhalb des *gtdA*-Gens wurden drei weitere Offene Leseraster (ORFs) gefunden. Die vorhergesagte Aminosäuresequenz von ORF 2 zeigte signifikante Homologien zu Enzymen mit Isomerase- oder Decarboxylasefunktion, ORF 3 und 4 zeigten signifikante Ähnlichkeiten zu Enzymen der Familie der Glutathion-S-Transferasen bzw. zu Glutathion-Reduktasen. Diese drei Enzyme spielen laut der Literatur beim Gentisat-Abbau eine wichtige Rolle. Versuche zur Überexpression der ORFs erfordern weitere Untersuchungen, um eine tatsächliche Beteiligung der Genprodukte dieser ORFs am Abbau von Gentisat nachweisen zu können.

Oberhalb des *gtdA*-Gens wurde ein 6.631 bp großes DNA-Fragment kloniert, sequenziert und analysiert. In diesem konnten 5 weitere ORFs, aber keine regulatorischen Elemente gefunden werden. Die Analyse der Aminosäuresequenzen der ORFs zeigte keine signifikanten Homologien (<10%) zu bisher bekannten Proteinen; eine Homologie zu der kürzlich veröffentlichten Sequenz für eine Salicylat-5-Hydroxylase, die im Abbauweg vor der GDO liegen sollte, war nicht vorhanden.

5 Literaturverzeichnis

Armengaud, J., Happe, B. und Timmis, K. N. (1998). Genetic analysis of dioxin dioxygenases of *Sphingomonas* sp. strain RW1: Catabolic genes dispersed on the genome. *J.Bacteriol.* **in press**.

Armengaud, J. und Jouanneau, Y. (1995). Overexpression in *Escherichia coli* of the *fdxA* gene encoding *Rhodobacter capsulatus* ferredoxin II. *Protein Expr Purif* **6**(2): 176-84.

Armengaud, J. und Timmis, K. N. (1997). Molecular characterization of *FdxI*, a putidaredoxin-type [2Fe-2S] ferredoxin able to transfer electrons to the dioxin dioxygenase of *Sphingomonas* sp. RW1. *Eur J Biochem* **247**(3): 833-42.

Armengaud, J. und Timmis, K. N. (1998). Molecular genetics of the degradation of dioxins by bacteria. In: Biodegradation of dioxins and furans. Wittich, R.-M. (ed.), Austin, Landes Bioscience: 75-123.

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. und Struhl, K. (1994). Current protocols in molecular biology. New York, John Wiley & Sons Inc.

Banat, M. I., Nigam, P. und Marchant, R. (1992). The Isolation and characterisation of a salicylat-hydroxylase-producing strain of *Pseudomonas putida*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**: 378-381.

Brückmann, M. (1996). Mikrobieller Abbau von Protoanemonin, ein Metabolit des Abbaus halogenierter Aromaten. Diplomarbeit, Fachbereich Chemie. Braunschweig, TU Braunschweig.

Bult, C. J., et al. (1996). Complete genome sequence of the methanogenic archaeon *Methanococcus jannaschii*. *Science* **273**(5278): 1058-73.

Buswell, J. A., Paterson, A. and Salkinoja-Salonen, M.S. (1980). Hydroxylation of salicylic acid to gentisate by a bacterial enzyme. *FEMS Microbiol. Lett.* **8**: 135-137.

Chalfie, M. (1995). Green fluorescent protein. *Photochem. Photobiol.* **62**(4): 651-656.

- Chaudhry, G. R. a. C., S. (1991).** Biodegradation of halogenated organic compounds. *Microbiological Reviews* **55**(1): 59-79.
- Chen, C.-M. und Tomasek, H. (1993).** Purification and Properties of gentisate 1,2-dioxygenase from *Arthrobacter* sp.strain GFB100. 93rd ASM General Meeting: K-101
- Crawford, R. L., Hutton, S.W. and Chapman, P.J. (1975).** Purification and properties of gentisate 1,2-dioxygenase from *Moraxella osloensis*. *J. Bacteriol.* **121**(3): 794-799.
- Crawford, R. L., Olson, P.E. and Frick, T.D. (1979).** Catabolism of 5-chlorosalicylic acid by a *Bacillus* isolated from the Mississippi River. *Appl. Environ. Microbiol.* **38**: 379-384.
- Crawford, R. L. und Frick, T. D. (1977).** Rapid spectrophotometric differentiation between glutathione-dependent and glutathione-independent gentisate and homogentisate pathways. *Appl Environ Microbiol* **34**(2): 170-4.
- Crawford, R. L., Hutton, S. W. und Chapman, P. J. (1975).** Purification and properties of gentisate 1,2-dioxygenase from *Moraxella osloensis*. *J Bacteriol* **121**(3): 794-9.
- Daubaras, D. L., Hershberger, C. D., Kitano, K. und Chakrabarty, A. M. (1995).** Sequence analysis of a gene cluster involved in metabolism of 2,4,5- trichlorophenoxyacetic acid by *Burkholderia cepacia* AC1100. *Appl Environ Microbiol* **61**(4): 1279-89.
- Domsch, K. H. (1992).** Pestizide im Boden: Mikrobieller Abbau und Nebenwirkungen auf Mikroorganismen. Weinheim, VCH Verlagsgesellschaft mbH.
- Dorn, E., Hellwig, M., Reinike, W. and Knackmuss, H.J. (1974).** Isolation and characterisation of a 3-chlorobenzoate degrading *Pseudomonad*. *Arch. Microbiol.* **9**: 61-77.
- Dorn, E. und Knackmuss, H.-J. (1978a).** Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds. Two catechol 1,2-dioxygenase from a 3-chlorobenzoate-grown *Pseudomonad*. *Biochemical Journal* **174**: 73-84.
- Dorn, E. und Knackmuss, H.-J. (1978b).** Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds. Substituent effects on 1,2-dioxygenation of catechol. *Biochemical Journal* **174**: 85-94.
- Dunn, N. a. E., W.C. (1964).** Transmissible plasmids coding early enzymes of naphthalene oxidation in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **114**: 974-979.

- Durham, D. R. und Stewart, D. B. (1987).** Recruitment of naphthalene dissimilatory enzymes for the oxidation of 1,4-dichloronaphthalene to 3,6-Dichlorosalicylate, a precursor for the herbicide Dicamba. *J. Bacteriol.* **169**(6): 2889-2892.
- Eltis, L. D. und Bolin, J. T. (1996).** Evolutionary relationships among extradiol dioxygenases. *J Bacteriol* **178**(20): 5930-7.
- Fewson, C. A. (1988).** Biodegradation of xenobiotic and other persistent compounds: the causes of recalcitrance. *Trends in Biotechnology* **6**: 148-153.
- Fortnagel, P., Harms, H., Wittich, R.-M., Krohn, S., Meyer, H., Sinnwell, V., Wilkes, H. und Francke, W. (1990).** Metabolism of dibenzofuran by *Pseudomonas* sp. strain HH69 and mixed culture HH27. *Appl Environ Microbiol.* **56**(4): 1148-1156.
- Franklin, F. C. H., Bagdasarian, M. M., Bagdasarian M. und Timmis, K. N. (1981).** Molecular and functional analysis of the TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida* and cloning of genes for the entire regulated aromatic ring *meta* cleavage pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,* **78**: 7458-7462.
- Frear, D. S. (1976).** The benzoic acid herbicides. In: Herbicides: Chemistry, Degradation and mode of action. Kearny, P. C. und Kaufmann, D.D (eds.). New York, Dekker.
- Fuenmayor, S. L., Wild, M., Boyes, A. L. und Williams, P. A. (1998).** A gene cluster encoding steps in conversion of naphthalene to gentisate in *Pseudomonas* sp. Strain U2. *J. Bacteriol.* **180**(9): 2522-2530.
- Geckeler, K. E. a. E., W. (1995).** Biogene Organochlorverbindungen - Vorkommen, Funktion, Umweltrelevanz. *Naturwissenschaften* **82**: 2-11.
- Ghisalba, O. (1983).** Chemical waste and their biodegradation - an overview. *Experientia* **39**(11): 1247-1257.
- Grund, E., Denecke, B. and Eichenlaub, R. (1992).** Naphthalene degradation via salicylate and gentisate by *Rhodococcus* sp. strain B4. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**(5): 1874-1877.
- Gutell, R. R., Weiser, B., Woese, C. R. und Noller, H. F. (1985).** Comparative anatomy of 16S-like ribosomal RNA. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **32**: 155-216.

Habig, W. H. und Jakoby, W. B. (1981). Assays for different glutathion *S*-transferases. *Methods Enzymol.* **77**: 398-405.

Hagedorn, S. R., Bayly, D.J. and Chapman, P.J. (1980). Bacterial degradation of 3-chlorosalicylic acid. Annu. Meet. ASM 1980: K-67.

Hagedorn, S. R. und Chapman, P. J. (1985). Glutathione-independent maleylacetoacetate isomerase in gram-positive bacteria. *J.Bacteriol.* **163**(2): 803-805.

Harayama, S., Kok, M. und Neidle, E. L. (1992). Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. *Annu Rev Microbiol* **46**: 565-601.

Harayama, S. und Timmis, K. N. (1992). Aerobic biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. In: Metals Ions in Biological Systems. Sigel, H. et al. (eds.). New York, Marcel Dekker: 99-15.

Harpel, M. R. und Lipscomb, J. D. (1990). Gentisate 1,2-dioxygenase from *Pseudomonas*: Substrate coordination to active site Fe²⁺ and mechanism of turnover. *J Biol Chem* **265**(36): 22187-96.

Harpel, M. R. und Lipscomb, J. D. (1990). Gentisate 1,2-dioxygenase from *Pseudomonas*: Purification, characterization, and comparison of the enzymes from *Pseudomonas testosteroni* and *Pseudomonas acidovorans*. *J Biol Chem* **265**(11): 6301-11.

Harpel, M. R. a. L., D.J. (1990). Gentisate 1,2-dioxygenase from *Pseudomonas*. *J. Biol. Chem.* **265**(11): 6301-6311.

Hasegawa, Y., Matsuura, K., Ohgama, H. and Tokuyama, T. (1994). Construction of a new shuttle vector pNVR-1012 and the cloning of salicylate hydroxylase gene in *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia Coli*. *J. Ferment. Bioeng.* **78**(5): 374-376.

Hegemann, G. D. (1966). Synthesis of the enzymes of the mandelate pathway by *Pseudomonas putida*. *Journal of Bacteriology* **91**: 1140-1154.

Heintz, A. a. R., G. (1991). Chemie und Umwelt. Braunschweig & Wiesbaden, Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft.

Hofer, B., Backhaus, S. und Timmis, K. N. (1994). The biphenyl/polychlorinated biphenyl-degradation locus (bph) of *Pseudomonas* sp. LB400 encodes four additional metabolic enzymes. *Gene* **144**(1): 9-16.

Hopper, D. J., Chapman, P. J. und Dagley, S. (1968). Enzymic formation of D-malate. *Biochem J* **110**(4): 798-800.

Iwabuchi, T. und Harayama, S. (1997). Biochemical and genetic characterization of 2-carboxybenzaldehyde dehydrogenase, an enzyme involved in phenanthrene degradation by *Nocardioides* sp. strain KP7. *J Bacteriol* **179**(20): 6488-94.

Jukes, T. H. a. C., C.R. (1969). Evolution of protein molecules. *In: Mamalian protein metabolism.* Munro, H. N. (ed.). New York, Academic Press. Inc.: 21-132.

Kaneko, T., et al. (1996). Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res* **3**(3): 109-36.

Keen, J. H. und Jacoby, W. B. (1980). Glutathione transferases. Catalysis of nucleophilic reactions of glutathione. *J. Biol. Chem.* **253**: 5654-5657.

Kiemer, P., Tshisuaka, B., Fetzner, S. und Lingens, F. (1996). Degradation of benzoate via benzoyl-coenzyme A and gentisate by *Bacillus stearothermophilus* PK1, and purification of gentisate 1,2-dioxygenase. *Biol Fert Soils* **23**: 307-313.

Knackmuss, H. J. (1983). Fremdstoffe in der Umwelt - Eine Herausforderung an die Biotechnologie. Stuttgart, J.B. Metzlersche Verlagsbuchhandlung.

Krueger, J. P., Butz, R.G. and Cork, D.J. (1990). Specifity of a *Flavobacterium* in the metabolism of substituted chlorobenzoates. *J. Indus. Microbiol.* **5**: 147-152.

Krueger, J. P., Butz, R. G., Atallah, Y. H. und Cork, D. J. (1989). Isolation and identification of microorganisms for the degradation of Dicamba. *J.Agric.Food-Chem.* **37**(2): 534-38.

Krueger, J. P., Butz, R. G. und Cork, D. J. (1991). Aerobic and anaerobic soil metabolism of Dicamba. *J.Agric.Food-Chem.* **39**(5): 995-99.

- Krueger, J. P., Butz, R. G. und Cork, D. J. (1991).** Use of dicamba-degrading microorganisms to protect dicamba susceptible plant species. *J.Agric.Food-Chem.* **39**(5): 1000-03.
- Lack, L. (1959).** The enzymic oxidation of gentisic acid. *Biochim. Biophys. Acta* **34**: 117-123.
- Lack, L. (1961).** Enzymic cis-trans isomerization of maleylpyruvic acid. *J Biol Chem* **236**: 2835-2840.
- Ladd, J. N. (1962).** Oxidation of anthranilic acid by a species of *Achromobacter* isolated from soil. *Nature* **194**: 1099-1100.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(259): 680-5.
- Lee, J., Min, K.R., Kim, Y.-C., Lim, J.-K., Yoon, H., Min, K.-H., Lee, K.-S. and Kim Y. (1995).** Cloning of salicylate hydroxylase gene and catechol 2,3-dioxygenase gene and sequencing of an interic sequence between the two genes of *Pseudomonas putida* KF 715. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **211**(2): 382-388.
- Lehrbach, P. R., Zeyer, J., Reineke, W. Knackmuss, H.-J. and Timmis, K.N. (1984).** Enzyme recruitment in vitro: use of cloned genes to extend the range of haloaromatics degraded by *Pseudomonas* sp. strain B13. *J. Bacteriol.* **158**: 1025-1032.
- Löffler, F., Müller, R. and Lingens, F. (1985).** Dehalogenation of 4-chlorobenzoate by 4-chlorobenzoate dehalogenase from *Pseudomonas* sp. CBS3: an ATP/coenzyme A dependent reaction. *Biophys. Res. Commun.* **176**: 1106-1111.
- Maiorino, M., Roche, C., Kiess, M., Koenig, K., Gawlik, D., Matthes, M., Naldini, E., Pierce, R. and Flohe, L. (1996).** A selenium-containing phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase in *Schistosoma mansoni*. *Eur. J. Biochem.* **238**: 838-844.
- Maltseva, O. V., Solyanikova, I. P. und Golovleva, L. A. (1994).** Chlorocatechol 1,2-dioxygenase from *Rhodococcus erythropolis* 1CP. Kinetic and immunochemical comparison with analogous enzymes from Gram-negative strains. *Eur. J. Biochem.* **226**: 1053-1061.

- Masai, E., Katayama, Y., Kubota, S., Kawai, S., Yamasaki, M. und Morohoshi, N. (1993).** A bacterial enzyme degrading the model lignin compound beta-etherase is a member of the glutathione-S-transferase superfamily. *FEBS Lett* **323**(1-2): 135-40.
- Mason, J. R. und Cammack, R. (1992).** The electron-transport proteins of hydroxylating bacterial dioxygenases. *Annu Rev Microbiol* **46**: 277-305.
- Monticello, D. J., Bakker, D., Schell, M. und Finnerty, W. R. (1985).** Plasmid-borne Tn5 insertion mutation resulting in accumulation of gentisate from salicylate. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**(4): 761-64.
- Nävecke, R. a. T., L. (1982).** Mikrobiol. Grundpraktikum. Braunschweig, Inst. für Mikrobiologie der TU Braunschweig.
- Nichols, N. N. und Harwood, C. S. (1995).** Repression of 4-Hydroxybenzoate Transport and Degradation by Benzoate: a new layer of regulatory control in the *Pseudomonas putida* *b*-Ketoadipate pathway. *J. Bacteriol* **177**(24): 7033-7040.
- Nozaki, M. (1973).** Metapyrocatechase (*Pseudomonas*). *Meth. Enzymol.* **17A**: 522-525.
- Ohmoto, T., Sakai, K., Hamada, N. und Ohe, T. (1991).** Salicylic acid metabolism through a gentisate pathway by *Pseudomonas* sp. TA-2. *Agric Biol Chem* **55**(7): 1733-1737.
- Ollsen, G. J. (1987).** The earliest phylogenetic branchings: comparing rRNA-based evolutionary trees inferred with various techniques. *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Mol. Biol.* **52**: 825-838.
- Orser, C. S., Dutton, J., Lange, C., Jablonski, P., Xun, L. und Hargis, M. (1993).** Characterization of a *Flavobacterium* glutathione S-transferase gene involved reductive dechlorination. *J Bacteriol* **175**(9): 2640-4.
- Pebay, M., Holl, A. C., Simonet, J. M. und Decaris, B. (1995).** Characterization of the *gor* gene of the lactic acid bacterium *Streptococcus thermophilus* CNRZ368. *Res. Microbiol.* **146**(5): 371-83.
- Perry, A. C., Ni Bhriain, N., Brown, N. L. und Rouch, D. A. (1991).** Molecular characterization of the *gor* gene encoding glutathione reductase from *Pseudomonas*

aeruginosa: determinants of substrate specificity among pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductases. *Mol. Microbiol.* **5**(1): 163-71.

Pfennig, N. a. L., K.D. (1966). Über das Vitamin B12-Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien. *Arch. Microbio.* **55**: 245-256.

Rothmel, R. K., Aldrich, T. L., Houghton, J. E., Coco, W. M., Ornston, L. N. und Chakrabarty, A. M. (1990). Nucleotide sequencing and characterization of *Pseudomonas putida catR*: a positive regulator of the *catBC* operon is a member of the LysR family. *J. Bacteriol.* **172**: 922-931.

Rubio, M. A., Engesser, K. H. und Knackmuss, H. J. (1986). Microbial metabolism of chlorosalicylates: effect of prolonged subcultivation on constructed strains. *Arch. Microbiol.* **145**(2): 123-25.

Saiki, R. K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. (1988). Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning. A laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory.

Schell, M. A. (1983). Cloning and expression in *Escherichia Coli* of the naphthalene degradation genes from plasmid NAH7. *J. Bacteriol.* **153**(2): 822-829.

Schindowski, A., Wittich, R. M. und Fortnagel, P. (1991). Catabolism of 3,5-dichlorosalicylate by *Pseudomonas* species strain JWS. *FEMS-Microbiol.Lett.* **84**(1): 63-70.

Schmitz, A., von Büнау, A., Zelloermann, E. M. und Eichenlaub, R. (1997). A novel pathway for the degradation of 4-chlorosalicylic acid. International Symposium Environmental Biotechnology, Oostende, European Federation of Biotechnology.

Scholten, D., Chang, K.H., Babbitt, P.C., Charest, H., Sylvestre, M. and Dunaway-Mariano, D. (1991). Novel enzymic hydrolytic dehalogenation of a chlorinated aromatic. *Science* **253**(182-185).

- Seltzer, S. (1989).** Maleylacetoacetate *cis-trans* isomerase. *In: Glutathione, chemical, biochemical and medical aspects.* Dolphin, D. et al. (eds.). New York, Wiley-Interscience: 733-751.
- Singleton, I. (1993).** Microbial metabolism of xenobiotics: Fundamental and applied research. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **59**: 9-23.
- Smith, A. E. (1973).** Transformation of Dicamba in Regina heavy clay. *J. Agric. Food Chem.* **21**: 708-710.
- Smith, A. E. (1974).** Breakdown of the herbicide Dicamba and its degradation product 3,6-dichlorosalicylic acid in prairie soils. *J. Agric. Food Chem.* **22**: 601-605.
- Smith, A. E. a. C., P.G. (1975).** Microbial degradation of the herbicide Dicamba in moist soils at different temperatures. *Weed Res.* **15**: 59-62.
- Stanier, R. Y. und Ornston, L. N. (1973).** The *b*-Ketoadipate Pathway. *Adv. Microbiol. Physiol* **9**: 89-151.
- Starovoitov, I. I., Nefedova, G. I., Yakovlev, A. M., Zyakun, A. M. und Adanin, V. M. (1975).** Gentisic acid as a microbial oxidation product of naphthalene. *Izv. Akad. Nauk. SSSR Ser. Khim.* **9**: 2091-2092.
- Suarez, M., Ferrer, E. and Martin, M. (1996).** Purification and biochemical characterization of gentisate 1,2-dioxygenase from *Klebsiella pneumoniae* M5a1. *FEMS Microbiol. Lett.* **143**: 89-95.
- Subramanian, M. V., Tuckey, J., Patel, B. und Jensen, P. J. (1997).** Engineering dicamba selectivity in crops: a search for appropriate degradative enzyme(s). *J. Ind. Microbiol Biotechnol.* **19**: 344-349.
- Suemori, A., Kurane, R. und Tomizuka, N. (1993).** Purification and properties of gentisate 1,2-dioxygenase from *Rhodococcus erythropolis* S-1. *Biosci Biotech Biochem* **57**(10): 1781-1783.
- Suemori, A., Nakayima, K., Kurane, R. und Nakamura, Y. (1995).** *o*-, *m*- and *p*-Hydroxybenzoate degradative pathways in *Rhodococcus erythropolis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **125**: 31-36.

- Sugiyama, S. I., Yano, K., Tanaka, H., K., K. und Arima, K. (1958).** Metabolism of aromatic compounds by bacteria, I. gentisic acid oxidase and protocatechuic acid oxidases of *Pseudomonas ovalis* S-5. *J Gen Appl Microbiol* **4**(4): 223-240.
- Takahashi, Y. und Nagata, T. (1992).** *parB*: an auxin-regulated gene encoding glutathione S-transferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(1): 56-9.
- Taraban, R. H., Berry, D. F., Berry, D. A. und Walker, H. L. (1993).** Degradation of Dicamba by an anaerobic consortium enriched from wetland soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**(7): 2332-34.
- van der Meer, J. R. (1997).** Evolution of novel metabolic pathways for the degradation of chloroaromatic compounds. *Antonie von Leeuwenhoek* **71**: 159-178.
- Vuilleumier, S. (1997).** Bacterial glutathione S-transferases: what are they good for? *J Bacteriol* **179**(5): 1431-41.
- Wang, X. Z., Li, B., Herman, P.L. and Weeks, D.P. (1995).** A three component O-demethylase enzyme from *Pseudomonas maltophilia* catalyzes the first step in degradation of the herbicide Dicamba. 95th ASM General Meeting: Q-237
- Weks, D. P., Wang, X. Z., Herman, P. L., Yang, J. und Hage, D. (1994).** Characterization of a bacterial system capable of degrading dicamba and evaluation of its potential in the development of herbicide-tolerant crops. *J. Cell. Biochem. Suppl.* **18A**: 91.
- Wheelis, M. L., Palleroni, N. J. und Stanier, R. Y. (1967).** The metabolism of aromatic acids by *Pseudomonas testosteroni* and *P. acidovorans*. *Arch Mikrobiol* **59**(1): 302-14.
- Wilkes, H., Wittich, R.-M., Timmis, K. N., Fortnagel, P. und Francke, W. (1996).** Degradation of chlorinated Dibenzofurans and Dibenzo-*p*-Dioxins by *Sphingomonas* sp. strain RW1. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**(2): 367-371.
- Wittich, R. M. (1994).** Der mikrobielle Abbau von Dibenzo-*p*-dioxinen, Dibenzofuranen, Diphenylethern und ihren Derivaten. *BioEngineering* **1/94**: 33-40.
- Woese, C. R., Gutell, R., Gupta, R. and Noller, H.F. (1983).** Detailed analysis of the higher-order structure of the 16S-like ribosomal ribonucleic acids. *Microbiol. Rev.* **47**: 621-669.

Xun, L., Topp, E. und Orser, C. S. (1992). Glutathione is the reducing agent for the reductive dehalogenation of tetrachloro-*p*-hydroquinone by extracts from a *Flavobacterium* sp. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **182**: 361-366.

Yabuuchi, E., Yano, I., Oyaizu, H., Hashimoto, Y., Ezaki, T. und Yamamoto, H. (1990). Proposals of *Sphingomonas paucimobilis* gen. nov. and comb. nov. *Sphingomonas parapaucimobilis* sp. nov., *Sphingomonas adhaesiva* sp. nov., *Sphingomonas capsulata* comb. nov., and two genospecies of the genus *Sphingomonas*. *Microbiol. Immunol.* **34**: 99-119.

Yamamoto, S., Katagiri, M., Maeno, H. and Hayaishi, O. (1965). Salicylate hydroxylase, a monooxygenase requiring Flavin Adenin Dinucleotide. *J. Biol. Chem.* **240**(8): 3408-3413.

Yang, J., Wang, X.Z., George, M., Hage, D.S., Cerny, R., Gross, M., Herman, P.L. and Weeks, D.P. (1995). Metabolism of Dicamba by *Pseudomonas maltophilia* strain DI-6. 95th ASM General Meeting:Q-132

Yang, J., Wang, X. Z., Hage, D. S., Herman, P. L. und Weeks, D. P. (1994). Analysis of dicamba degradation by *Pseudomonas maltophilia* using high-performance capillary electrophoresis. *Anal Biochem* **219**(1): 37-42.

Yano, K.-M. a. A. (1958). Metabolism of aromatic compounds by bacteria II. m-hydroxybenzoic acid hydroxylase A and B; 5-dehydroshikimic acid, a precursor of protocatechuic acid a new pathway from salicylic acid to gentisic acid. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **4**: 241-258.

Yen, K. M. a. G., I.C. (1982). Plasmid gene organisation: naphthalene/salicylate oxidation. *Proc. Acad. Sci. U.S.A.* **79**: 874-878.

6 Anhang

Tabelle 12: Synthetische Oligonukleotidprimer zur Subklonierung von ORF2 bis ORF 4. Die künstlichen Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

| Primer Nr. | Primer- Richtung | Primer zur Amplifizierung von | Primer-Sequenz |
|---------------|---------------------|-------------------------------------|---|
| jw105 | vorwärts | ORF2 | 5`-AAAACATATGACCATGGTTTTTGACCCGTCTGC-3` |
| jw106 | rückwärts | ORF2 | 5`-GTTTGGATCCTCAGCGCGCCGGCTCGGCTATGC-3` |
| jw107 | vorwärts | ORF3 | 5`-TATACATATGCTCGAACTCTATCATGACTGGC-3` |
| jw108 | rückwärts | ORF3 | 5`-CGTCGGATCCTCAGGCGATGACGGCCGCAGCGAAGCG-3` |
| jw110 | rückwärts | ORF4/ORF2-4 | 5`-CGCGGATCCTCATCTCAACAGAACCAGCTCTTCGG-3` |
| jw111 | vorwärts | ORF4 | 5`-GAATTCTGACCTTGAGACGTACCGCC-3` |
| jw112 | vorwärts | ORF2-4 | 5`-GAATTCCTGCCAGCAAAAGCTCGGGC-3` |

Abbildung 15: Nukleotidsequenz des 4.103 bp großen *SfuI*-Fragmentes in pJW39

[illegible]

Abbildung 16: Nukleotidsequenz des 6.631 bp großen *EcoRI*-Fragmentes in pJW9

| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 |
|--|----|----|----|------|
| 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 | | | | |
| GAAGGTTTAA CCGGCTGTTT TTGGGCTTAT AGTTGGTGGC GAGGCGTGG | | | | 2750 |
| TATGGGATAT GTCGAGGAT ATCGAGGCGC GTTCCGCGCG | | | | 2800 |
| CAGGAGGCGC ATTGCGATCA GCGTTGCGAC GAGGAGAGAG ATTGAGAAC | | | | 2850 |
| TGGGTTATGG TACGATGCGC TACGTTGCGG GCGGCGGCGC TTGCGTTGCT | | | | 2900 |
| CGAGGAGGAT GAGGAGGCGC TACGATGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC | | | | 2950 |
| GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC | | | | 3000 |
| GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC | | | | 3050 |
| GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC | | | | 3100 |
| GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC | | | | 3150 |
| GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC | | | | 3200 |
| GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC | | | | 3250 |
| GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC | | | | 3300 |
| GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC | | | | 3350 |
| GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC | | | | 3400 |
| GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC | | | | 3450 |
| GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC | | | | 3500 |
| GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC | | | | 3550 |
| GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC | | | | 3600 |
| GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC | | | | 3650 |
| GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC | | | | 3700 |
| GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC | | | | 3750 |
| GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC | | | | 3800 |
| GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC | | | | 3850 |
| GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC | | | | 3900 |
| GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC | | | | 3950 |
| GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC | | | | 4000 |
| GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC | | | | 4050 |
| GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC | | | | 4100 |
| GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC | | | | 4150 |
| GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC | | | | 4200 |
| GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC | | | | 4250 |
| GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC | | | | 4300 |
| GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC | | | | 4350 |
| GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC | | | | 4400 |
| GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC | | | | 4450 |
| GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC | | | | 4500 |
| GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC | | | | 4550 |
| GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC | | | | 4600 |
| GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC | | | | 4650 |
| GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC | | | | 4700 |
| GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC | | | | 4750 |
| GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC | | | | 4800 |
| GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC | | | | 4850 |
| GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC | | | | 4900 |
| GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC | | | | 4950 |
| GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC | | | | 5000 |
| GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC | | | | 5050 |
| GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC | | | | 5100 |
| GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC | | | | 5150 |
| GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC | | | | 5200 |
| GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC | | | | 5250 |
| GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC | | | | 5300 |
| GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC | | | | 5350 |
| GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC GAGGAGGCGC | | | | 5400 |

| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 |
|--|----|----|----|----|------|
| 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 | | | | | |
| 0080CT0080 CTGGCTATGA CCGTCGATGA AGTCGAGGAG CCGACGAGAG | | | | | 5450 |
| GGATGACTCT CCGAGGCGAA CATTCTTGAG CGACCTCGAA AAGGTTGAGC | | | | | 5500 |
| CTTACCGATG GCGGATTTT ACTCGCGGCG GATCGCGACA ATCGCGCGCC | | | | | 5550 |
| TCCATGAGCT GATTTCGCA CCGCGATGCA TTAGCGCGAG CGATTCTGAGC | | | | | 5600 |
| GGTCAGGCTG CTGTCGATG AGCGATTCGA TCGCGCGAGC GATCTCTGAG | | | | | 5650 |
| TGATCGGGA ACTCGCGAGT GATATGATG ACATCAGCTT GCGCTGCGAG | | | | | 5700 |
| GGTATCGGCG CAAACCGATG ATTAGCTTGA GCGCTTCGA AGAGTTGCGG | | | | | 5750 |
| TTTATCGGAG CATTCTCAT TATTAATATA ATTTCATTT GCGCATATAC | | | | | 5800 |
| TGATCGGCTC TTATCTGCG TATTACGCGC GAGAGCGCGA TCGCGCTGCA | | | | | 5850 |
| TATGAGGAGT CATTGCGAG GCGAGGAGAG ATTATGCGAG CCGATTTAG | | | | | 5900 |
| CGATGATGCT GATGCTGCA CTGCTGCGC TTATGATGGA ATGCGCGCGG | | | | | 5950 |
| GCATGAGCTGA AAGCGTTGAG GAGATGCTG CATTGCTGAG GAGTTGCGG | | | | | 6000 |
| ACCGCGATG CTGCGCGATG GCGATCATG GCGATATGAT GAGTTGCGG | | | | | 6050 |
| ACTTTTACT GCGATCGAGC GATCTGATTT CTGCGAGCGA GCGCGATCGA | | | | | 6100 |
| CGGATCTGA TTCTGAGAAA TCGCGCTGCG GAGGATCAT GCGCATATAC | | | | | 6150 |
| CGGTCAGCTC TTATCGCGAGC TTGATCATTT TTGCGCGAGC GATCTCGCGC | | | | | 6200 |
| CATGTCATG CCGAGCGCGA TATGCGCTGAG GATTCATCTT CGAGCGCGAG | | | | | 6250 |
| GGGCGCTGTA CCGCTGATGA GAGCGAGAAA GCTGATGAT GCGCTTTCGA | | | | | 6300 |
| CGTATCTCTC ACGCTGAGG GTCATGAGCA TCGCATGAGG ACGCGAGCG | | | | | 6350 |
| ACGATCGAT GATCTGAGCT GACGCGCTGAG ATATTCATAC GATGCGCGAT | | | | | 6400 |
| TTGAGCGCGA GTTTCGCGGA AATATGAGG GAGCGCGAC ATCTGATAT | | | | | 6450 |
| GCGCGCGCTT GAGGATGATC TCGCGCGCTGA TCGCGCATAT TTGCGCGCGA | | | | | 6500 |
| TGCGCGCGAC CAGCGCGAC CGCGCGCGA CCGCGCGCGC GCTATTCAT | | | | | 6550 |
| TTATCTTATGA AGCGATGCGG AGCGCGCGTT GATCATGAG CATTGAGCTGCG | | | | | 6600 |
| GATGATCGAT CCGATCTTGA GTCAGCGACT C | | | | | 6631 |

Abkürzungen

| | |
|------------|--|
| Ap | Ampicillin |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| bzw. | beziehungsweise |
| Cm | Chloramphenicol |
| C-Quelle | Kohlenstoff-Quelle |
| 36DC2MBA | 3,6-Dichlor-2-Methoxybenzoat |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| ϵ | molarer Extinktionskoeffizient [$\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$] |
| E.C. | Enzyme Collection |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| FPLC | Schnelle Protein-Flüssigkeits Chromatographie |
| GC-MS | Gaschromatographie-Massenspektroskopie |
| GDO | Gentisat-1,2-Dioxygenase |
| HPLC | Hochdruckflüssigkeitschromatograph(ie) |
| inkl. | inklusive |
| IPTG | Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid |
| Kb | Kilobasen |
| λ | optische Wellenlänge [nm] |
| LB | Luria Bertani-Medium |
| mRNA | messenger RNA, Boten-RNA |
| m/z | Ionenmasse/Ionenladung |
| NAD(H) | Nicotinamidadenindinucleotid |
| OD | optische Dichte |
| ORF | open reading frame, offenes Leseraster |
| PCR | Polymerase Kettenreaktion |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| upm | Umdrehungen pro Minute |
| RT | Raumtemperatur |
| <i>S.</i> | <i>Sphingomonas</i> |
| SDS | Natrium-Dodecylsulfat |
| sp. | species |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| U | units, internationale Enzymeinheit [$\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$] |
| u.a. | unter anderem |

| | |
|---------|--|
| UV | ultraviolett |
| TCC | Zitronensäurezyklus |
| Vol | Volumen |
| z.B. | zum Beispiel |
| X-gal | 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galctosid |
| % (v/v) | Volumenprozent |
| % (w/v) | Gewichtsprozent |

Danksagungen

Herrn Professor Dr. K. N. Timmis danke ich für Überlassung des interessanten Themas und für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen.

Herrn Dr. Rolf-M. Wittich danke ich für die Betreuung und Durchsicht des Manuskriptes.

Bei Frau Gunilla Kreissel und Herrn Dr. H.A. Arfmann möchte ich für die Synthese von 3,6-Dichlorgentisinsäure bedanken, ohne die ein wichtiger Teil dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Frau Silke Backhaus danke ich für das unermüdliche Sequenzieren meiner zahlreichen Sequenzreaktionen.

Herrn Dr. E.R.B. Moore und seinem Labor danke ich für die Unterstützung bei der Sequenzierung der 16S rDNA des Stammes RW 5 und Herrn Dr. Michael Kies für die Aminosäure-Sequenzierung der Gentisinsäure-1,2-Dioxygenase.

Mein ganz besonderer Dank gilt aber allen Kollegen in der Arbeitsgruppe Biodegradation und Abteilung Mikrobiologie für die nette und gute Unterstützung während der letzten Jahre.

Danke Krümel!

Lebenslauf

Name: Jörn Werwath
Geburtsdatum/-ort: 21.04.1969 in Bielefeld
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

| | |
|-----------------|-------------------------------|
| 8/1975 - 7/1979 | Fröbel-Grundschule, Bielefeld |
| 8/1979 - 6/1988 | Ceciliengymnasium |
| 6/1988 | Abitur |

Grundwehrdienst:

| | |
|-------------------|--|
| 10/1988 - 12/1989 | Panzergrenadierbataillon 211, Augustdorf |
|-------------------|--|

Beruflicher Werdegang:

| | |
|------------------|--|
| 10/1989 - 4/1995 | Biologiestudium an der Technischen Universität |
| 9/1991 | Vordiplom |
| 4/1995 | Abschluß als Diplom-Biologe |
| 6/1994 - 4/1995 | Externe Diplomarbeit bei der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, Abteilung Mikrobiologie, Braunschweig. Thema: „Charakterisierung des mikrobiellen Abbaus haloaromatischer Agrochemikalien“ |
| 6/1995-6/1998 | Anfertigung der vorliegenden Dissertation bei der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, Abteilung Mikrobiologie in Braunschweig |